



HEVs

haute école valaisanne
hochschule wallis
sciences de l'ingénieur

Filière Technologies du vivant

Orientation Technologie alimentaire

Diplôme 2006

Nathalie Mayoraz—Devantéry

*Application de succédanés de souches de "Bacillus"
dans différents processus technologiques de réchauffement
après détermination de leur résistance à la chaleur
par la méthode capillaire*



HEVs

Route du Rawyl 47
1950 Sion 2

haute école valaisanne
hochschule wallis

Professeur

Esther Schmitt

Expert

Katia Szynalski

HES-HEVS-T (Sion)



EM000005224519

Sion, le 24 novembre 2006

TV / 2006 / 36

Hes-so

Haute Ecole Spécialisée
de Suisse occidentale
Fachhochschule Westschweiz
University of Applied Sciences
Western Switzerland



HEVs

haute école valaisanne
hochschule wallis

APPLICATION DE SUCCÉDANÉS DE SOUCHES DE *BACILLUS* DANS DIFFÉRENTS PROCESSUS TECHNOLOGIQUES DE RÉCHAUFFEMENT APRÈS DÉTERMINATION DE LEUR RÉSISTANCE À LA CHALEUR PAR LA MÉTHODE CAPILLAIRE

Objectif : Les objectifs de ce travail de diplôme sont la production de spores de *B. atrophaeus*, *B. coagulans* et *B. cereus* ; la détermination de la résistance à la chaleur par méthode capillaire des spores déjà à disposition et celles nouvellement fabriquées ; la comparaison des résistances à la chaleur des spores ; l'application des succédanés de *B. cereus* dans la cuisson-extrusion ainsi que la proposition de procédures pour le développement et la validation de succédanés.

Résultats :

La production de spores a relevé que les espèces ne sporulent pas de la même manière.

La détermination de la résistance à la chaleur par méthode capillaire a constaté que : lors d'un stockage dans du tampon phosphate, la résistance à la chaleur des spores de *B. atrophaeus* n'est pas stable ; les spores de *B. atrophaeus* ne seraient pas de bon surrogates pour celles de *B. cereus* puisqu'elles ne sont d'une part pas assez résistantes aux alentours de 90 °C et trop résistantes vers 120 °C et possèdent d'autre part une valeur z trop élevée; les spores de *B. coagulans* pourraient être de bon surrogates de *B. cereus* pour une plage de température définie, mais des tests supplémentaires sont nécessaires pour valider cette affirmation.

L'application de spores de *B. atrophaeus* dans le processus de cuisson-extrusion montre que ce traitement serait relativement efficace pour réduire le risque lié à des spores de *B. cereus* présentes dans la matière à extruder.

Un protocole de procédures pour développer et valider des surrogates a été proposé.

Mots-clés : *Bacillus atrophaeus*, *coagulans*, *cereus*, succédanés, surrogate, résistance à la chaleur, méthode capillaire, extrusion

Nathalie Mayoraz-Devantéry

HEVs

Filière technologies du vivant

Orientation agroalimentaire

Laboratoire de microbiologie, L 206

23. novembre 2007

TABLES DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
1.1	OBJECTIFS	1
1.2	PARTIE THÉORIQUE	1
1.2.1	Production de spores	1
1.2.2	Résistance à la chaleur	2
1.2.3	Industrie et procédés technologiques.....	4
1.2.4	Surrogates.....	4
1.2.5	Hazard Analysis Critical Control Point.....	6
1.2.6	Le genre Bacillus.....	6
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	8
2.1	MATÉRIEL	8
2.2	MÉTHODES	12
2.2.1	Production	12
2.2.2	Résistance à la chaleur	12
2.2.3	Procédés technologiques de chauffage	13
2.2.4	Choix d'un surrogate	15
3	RÉSULTATS	16
3.1	PRODUCTION.....	16
3.2	RÉSISTANCE À LA CHALEUR	18
3.2.1	B. atrophaeus.....	18
3.2.2	B. coagulans.....	25
3.2.3	B. cereus	27
3.3	PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES DE CHAUFFAGE	30
3.3.1	Analyses physiques.....	30
3.3.2	Analyses microbiologiques.....	32
3.4	CHOIX D'UN SURROGATE	33
4	DISCUSSION	36
4.1	PRODUCTION.....	36
4.2	RÉSISTANCE À LA CHALEUR	36
4.2.1	Répétabilité et limite de la méthode	37
4.2.2	Fiabilité des valeurs D et z, trainées et influences	37

4.2.3	Stabilité des spores de <i>B. atrophaeus</i> stockées à 4 °C dans du tampon phosphate.....	38
4.2.4	Droites d'inactivation thermique	39
4.2.5	Taux de réduction décimal D.....	39
4.2.6	Valeur z	42
4.2.7	Bien fondé des surrogates proposés.....	43
4.3	PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES DE CHAUFFAGE	44
4.4	CHOIX D'UN SURROGATE	45
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	46
6	REMERCIEMENTS.....	47
7	BIBLIOGRAPHIE	47
8	ANNEXES	52

1 INTRODUCTION

1.1 OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail de diplôme sont :

- La production de grandes quantités de spores de *B. atrophaeus*, *B. coagulans* et *B. cereus*.
- La répétition de la détermination de la résistance à la chaleur par méthode capillaire des spores de *B. atrophaeus* produites par Federica Milani dans le cadre de son travail de diplôme en 2005 [1] ainsi que des spores produites dans le cadre de ce travail de diplôme.
- La comparaison de la résistance à la chaleur des spores de *B. atrophaeus* et *B. coagulans* vis-à-vis de celles de *B. cereus*.
- L'introduction de succédanés ou « surrogates » dans un procédé technologique de chauffage tel que la cuisson-extrusion et la recherche du taux de survie des succédanés.
- La proposition de procédures appropriées au développement et à la validation de surrogates.

1.2 PARTIE THÉORIQUE

1.2.1 Production de spores

Lorsque les conditions extérieures deviennent défavorables (manque de substrat, température inadaptée, présence de substances chimiques indésirables...), les bactéries du genre *Bacillus* ont la possibilité de sporuler. La vitesse de sporulation ainsi que les propriétés des spores dépendent de la souche ainsi que des conditions extérieures lors de la sporulation.

Vitesse de sporulation

De manière générale, les souches qui produisent des toxines sporulent nettement plus vite que celles qui produisent des toxines diarrhéigènes. [2]

Résistance à la chaleur des spores

La résistance à la chaleur dépend tout d'abord de la souche considérée. Ensuite, il peut avoir des modulations à l'intérieur d'une même souche suivant la température de sporulation et la composition du milieu de sporulation. [3]

Un des objectifs de ce travail de diplôme est de produire une quantité maximale de spores de *B. atrophaeus* et *B. coagulans* ayant une résistance à la chaleur la plus proche de *B. cereus*. L'optimum serait de déterminer la résistance à la chaleur des souches de *B. atrophaeus* et *B. coagulans* produites. Ensuite, en fonction des résultats obtenus, de proposer de varier si nécessaire les conditions de sporulation afin d'obtenir une valeur de résistance à la chaleur la plus proche de celle de *B. cereus*.

1.2.2 Résistance à la chaleur

La notion de résistance à la chaleur des spores est très importante puisqu'elle détermine si une procédure de chauffage éradique ou non une population de spores. Il existe 2 types de chaleur auxquelles peuvent être confrontés les microorganismes : la chaleur sèche et la chaleur humide. Pour la chaleur sèche, le milieu de chauffage possède une valeur $a_w < 1$ et pour la chaleur humide, la valeur a_w du milieu est de 1. En pratique, on parle de chaleur sèche pour les fours (incinération) ou pour les flammes (bec Bunsen) et de chaleur humide pour les autoclaves, la vapeur ou l'eau bouillante. Expérimentalement, la résistance à la chaleur humide peut-être déterminée par le chauffage d'une suspension dans différents conteneurs (sachets, tubes de verres scellés ou fermés à l'aide de capsules, tubes de verres capillaires et tubes, canettes ou serpentins en métal) ainsi que dans différents milieux de chauffage (bain d'eau ou d'huile et autoclave à vapeur).

Dans le cadre de ce travail de diplôme, la détermination de la résistance à la chaleur humide sera étudiée en utilisant la méthode capillaire étant donné que c'est une méthode qui a fait ses preuves et qui est fréquemment utilisée dans les publications. Le but sera de réitérer les essais avec les spores de *B. atrophaeus* produites par Federica Milani [1] ainsi qu'avec celles fraîchement produites dans le cadre de ce travail de diplôme. Cette détermination se fera en utilisant la méthode préalablement développée dans le cadre du travail de semestre. [4]

Depuis 1920, le modèle d'inactivation thermique utilisant les valeurs D et z a été utilisé en microbiologie. Cette approche permet de calculer de manière rapide l'inactivation subie par les microorganismes et simplifie les comparaisons entre process thermiques. Cependant, des déviations de ce modèle log-linéaire telles que des « traînées », « queues », « tailing » ... ont été observées à de nombreuses reprises. Des modèles alternatifs sont donc en train d'être développés par plusieurs scientifiques. Il se pourrait donc qu'à moyen terme, l'industrie soit encouragée à revoir ses process basés sur les valeurs D, z et F_0 . [5], [6], [7]

Les nouveaux modèles étant encore en phase d'expérimentation, il a été décidé d'utiliser encore les valeurs D et z dans ce travail de diplôme afin de pouvoir établir des comparaisons avec les publications antérieures. De plus, les valeurs D et z permettent de donner rapidement une bonne estimation de la sensibilité d'une souche vis-à-vis de la chaleur.

La valeur D est le temps (en minutes) nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 (ou de 90%) le nombre initial de germes N_0 , pour un micro-organisme donné et dans des conditions précises. Elle se calcule par la formule suivante :

$$D_{T^{\circ}C} = \frac{t}{\log N_0 - \log N} \quad [\text{min}] \quad [8]$$

Légende :

t : durée du traitement [min]

N_0 : nombre de germes initial [-]

N : nombre de germes après t minutes de traitement [-]

La valeur z est l'écart de température requis pour obtenir un taux de réduction d'un facteur 10. La valeur z se calcule donc à l'aide de l'équation suivante :

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \quad [^{\circ}C] \quad [8]$$

Légende :

T_1 : 1^{ère} température à laquelle a lieu le traitement [$^{\circ}C$]

T_2 : 2^{ème} température à laquelle a lieu le traitement [$^{\circ}C$]

D_1 : valeur D pour la 1^{ère} température [min]

D_2 : valeur D pour la 2^{ème} température [min]

La valeur z peut aussi se déterminer de manière graphique, en représentant le logarithme de la valeur D en fonction des différentes températures testées. Une droite de régression linéaire du premier ordre est ensuite tracée. La valeur z correspond à l'inverse de la pente de cette droite. Cette manière de calculer permet d'obtenir une moyenne et sera utilisée dans les expériences de ce travail de diplôme.

1.2.3 Industrie et procédés technologiques

La production de spores ainsi que la détermination de leur résistance à la chaleur ont comme finalité une application industrielle. En effet, de nombreux procédés de traitement des denrées alimentaires utilisent la chaleur pour inactiver les spores de pathogènes. La cuisson-extrusion, le séchage, l'évaporation ou la pasteurisation en sont quelques exemples. Dans ce travail de diplôme, le processus de cuisson-extrusion à expansion directe a été choisi pour expérimenter la résistance à la chaleur des surrogates potentiels de *B. cereus*. L'extrusion à froid et la cuisson-extrusion à expansion directe ou indirecte sont des opérations unitaires de transformation. Elles consistent à faire passer sous pression et à travers un orifice de faible diamètre une pâte chauffée afin d'obtenir un produit aux propriétés organoleptiques, rhéologiques, biochimiques ou nutritionnelles relativement différentes de la pâte d'origine. L'étude de l'extrusion dans ce travail de diplôme semble appropriée, puisque ce process prend une place de plus en plus importante dans l'industrie agroalimentaire. Pour assurer que le traitement éradiquerait les spores de *B. cereus* potentiellement présentes dans la matière première, il faut tout d'abord considérer la matrice alimentaire utilisée ainsi que les paramètres temps et température appliqués. Les calculs en découlant ne sont toutefois qu'approximatifs étant donné la complexité de tels traitements. L'optimum serait donc d'introduire directement les spores de *B. cereus* dans l'aliment à traiter et de dénombrer les spores avant et après le traitement. Ceci est rarement effectué étant donné la pathogénité de *B. cereus*. Une alternative possible est l'introduction de spores non-pathogènes ayant un comportement ressemblant à celui de *B. cereus* vis-à-vis de la chaleur. Ceci va être réalisé dans ce travail de diplôme à l'aide de spores de *B. atrophaeus*.

Il est donc utile d'étudier et d'utiliser des espèces proches telles que *B. atrophaeus* ou *B. coagulans* qui sont alors appelées succédanés, substituts ou surrogates potentiels de *B. cereus*.

1.2.4 Surrogates

En microbiologie, on utilise souvent les termes « indicateur » et « surrogate ». Ces termes ne sont cependant pas égaux, il convient donc de donner quelques définitions afin de clarifier la situation. [9]

- indicateur : organisme dont la présence indique qu'une denrée alimentaire a été exposée à des conditions qui augmentent le risque de contamination de l'aliment par un pathogène. Exemple : *E. coli* est l'indicateur d'une contamination fécale.

- succédané, substitut ou surrogate en anglais : microorganisme ou matériel représentatif qui remplace un pathogène dans des études telles qu'évaluation, contrôle de validation ou process d'intervention telles que procédures de décontamination chimique ou physique.

Dans l'industrie, il est commun d'utiliser : [10]

- Clostridium sporogenes* ou *Bacillus stearothermophilus* comme surrogate pour *Clostridium botulinum*
- Listeria innocua* comme surrogate pour *Listeria monocytogenes*
- Des souches d'*Escherichia coli* non pathogènes comme surrogates de *Escherichia coli* O157 : H7
- Bacillus cereus* comme surrogate pour *Bacillus anthracis*

Aucun surrogate de *Bacillus cereus* n'a été trouvé dans la littérature. En effet, les seules données récoltées concernent des indicateurs utilisés pour assurer qu'un traitement a inactivé toute forme de bactéries. Il s'agit des spores les plus résistantes de *Bacillus* pour chaque traitement considéré. Voici quelques exemples courants :

- Les spores de *Bacillus atrophaeus* (classifié autrefois comme *Bacillus subtilis* subsp. *niger*) (ATCC #9372) sont utilisées comme indicateur pour des stérilisations à la chaleur sèche et à l'oxyde d'éthylène.
- Les spores de *Geobacillus stearothermophilus* (classifié autrefois comme *Bacillus stearothermophilus*) (ATCC #7953) sont utilisées comme indicateur pour des stérilisations à la chaleur humide.
- Les spores de *Bacillus pumilus* (ATCC #27142) sont utilisées comme indicateur pour des stérilisations à la radiation. [11]

Dans ce travail de diplôme, il ne s'agit pas de déterminer si le traitement par chaleur humide (cuisson-extrusion) a détruit les spores les plus thermorésistantes, mais de savoir s'il a inactivé les spores de *Bacillus cereus*. L'utilisation de *Geobacillus stearothermophilus* ne serait donc pas adapté ici. Pour ceci, le choix d'une souche a été discuté dans le travail de semestre et les résultats pencheraient en faveur de souches de *Bacillus atrophaeus* et *Bacillus coagulans*. [4]

1.2.5 Hazard Analysis Critical Control Point

Si les organismes surrogates sont utilisés principalement dans le système Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), les organismes indicateurs sont plutôt utilisés dans les bonnes pratiques de fabrication (Good Manufacturing Practices : GMPs). En effet, la présence d'un organisme indicateur n'implique pas nécessairement la présence d'un pathogène, mais elle rend simplement attentif que les bonnes pratiques de fabrication n'ont pas été respectées.

Les organismes surrogates prennent leur entière signification dans le système HACCP. Un des points critiques pour l'implantation d'un système HACCP est la validation des limites critiques associées aux points de contrôle critiques. Pour la validation, des approches telles que la simulation du process en laboratoire, la tradition ou l'absence présumée de risque de transmission de pathogènes par l'aliment peuvent manquer de rigueur scientifique. Cependant, il n'est pas aisé de travailler directement dans l'industrie avec des pathogènes étant donné les risques engendrés. Pour ceci, il est utile d'employer une souche non pathogène qui possède une croissance ou une cinétique de survie relativement similaire à celles du pathogène. L'utilisation d'un surrogate adapté permet donc à l'industrie d'effectuer des tests pilotes utiles à la validation, en évitant les risques liés à l'utilisation d'un pathogène ou l'incertitude d'une simulation laboratoire. En outre, la « Food and Drug Administration » (FDA) et la « United States Department of Agriculture » (USDA) encouragent l'utilisation de surrogates pour la validation des limites critiques. [12]

1.2.6 Le genre *Bacillus*

Dans le cas de ce travail de diplôme, *B. atrophaeus* et *B. coagulans* ont été étudiés comme surrogates potentiels de *B. cereus*. Voici donc brièvement les caractéristiques de ces souches.

B. cereus est une bacille gram-positif, aérobie et anaérobie facultatif en présence de glucose ou de nitrate. C'est une bactérie pathogène puisqu'elle a la possibilité de produire 2 sortes de toxines (diarrhéigène et émétisante) qui provoquent des intoxications alimentaires. Ces toxi-infections succèdent souvent à l'ingestion d'aliments abandonnés plusieurs heures à température ambiante après leur préparation et ayant permis une forte prolifération bactérienne. *B. cereus* peut être encore caractérisé par des tests positifs de la catalase, de l'oxydase ainsi que de l'hémolysine. Cette bactérie phospholipase C se trouve principalement dans le sol, les épices, les céréales, les légumes secs ainsi que dans les excréments d'animaux. Sa température optimale de croissance se situe entre 30 °C et 35 °C. Elle peut cependant rester active à des températures s'abaissant jusqu'à 10-12 °C ou s'élevant jusqu'à 48-50 °C. [13]

La résistance à la chaleur humide de ses cellules végétatives peut être résumée par les valeurs D suivantes :

$$D_{100^{\circ}\text{C}} = 1.2-7.5 \text{ min [13]} \text{ et } D_{115^{\circ}\text{C}} = 0.13-4.5 \text{ min [13]}$$

Si les conditions extérieures sont défavorables, *B. cereus* a la possibilité de se protéger en sporulant. Il existerait 2 souches très différentes quant à la résistance de leurs spores. Les valeurs D maximum lors de traitements thermiques avec chaleur humide, livrée par les études qui se sont intéressées aux 2 souches, sont les suivantes :

$$D_{121^{\circ}\text{C}} = 0.03 \text{ min [14]} \text{ et } D_{121^{\circ}\text{C}} = 2.35 \text{ min [15]}$$

Avec une valeurs z allant de 7.9 à 9.9 °C [3]

B. atrophaeus est une bacille gram-positif, aérobie, en forme de bâtonnets, pouvant former des spores et dont la description est pratiquement identique à celle de *B. subtilis*. La seule différence réside dans la production d'un pigment lorsque le milieu de culture contient une source d'azote organique. Jusqu'en 1989, beaucoup d'isolats de *B. atrophaeus* étaient classés, sous *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *niger* ou *B. globigii*. Plusieurs de ces souches sont utilisées comme organismes de contrôle pour des stérilisations à la chaleur sèche ou à l'oxyde d'éthylène. [16], [17], [18]

Il s'est avéré la souche étudiée (DSM 7264) était composée de deux populations bien distinctes. Les valeurs D des spores, trouvées dans le cadre du travail de Federica Milani ainsi que du travail de semestre précédant de travail de diplôme, sont les suivantes :

$$D_{121^{\circ}\text{C}} = 0.3-0.6 \text{ min [1],[4]} \text{ et } D_{121^{\circ}\text{C}} = 1.2-5.3 \text{ min [1],[4]}$$

B.s coagulans est une bacille gram-positif, aérobie et anaérobie facultatif, en forme de bâtonnets mobiles, souvent isolée, pouvant sporuler. La température optimale de croissance de cette bactérie est comprise entre 35 °C et 50 °C à un pH de 5.5 à 6.5. Elle est catalase positive, mais ne fermente pas le maltose, le mannitol, le raffinose, le sucrose ou le trehalose. La production d'acide lors de son métabolisme en fait un microorganisme d'altération. [19]

Les valeurs D caractérisant les spores, fournies par la littérature, sont les suivantes :

$$D_{100^{\circ}\text{C}} = 10.0 \text{ min [20]} \text{ et } D_{121^{\circ}\text{C}} = 3.0 \text{ min [3]}$$

Avec une valeur z de 7.2 °C [21]

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

Souches

- *B. atrophaeus*, DSM 7264 (ATCC 49337), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (D)
 - colonies inoculées par Federica Milani le 05.12.05 et conservées sur plaque de Nutrient Agar [1]
 - suspension de spores dans du tampon phosphate 0.067 M (pH = 7), préparée par Federica Milani le 31.10.05 [1]
- *B. coagulans*, DSM 1 (ATCC 7050), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (D)
- *B. cereus*, DSM 31 (ATCC 14579), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (D), colonies inoculées le 24.08.06 par le laboratoire de microbiologie de la HEVs et conservées sur plaque de Tryptic Soy Agar (TSA) [22]
- *B. cereus* wild type, culture typique (bâtonnets qui sporulent, croissance avec halo sur le milieu *Bacillus cereus* agar MYP et hémolyse positif sur le milieu Columbia Agar + 5% sheep blood (COS)) provenant d'une suspension de spores de plusieurs souches de *B. cereus* fournie par Nestlé Konolfingen, purifiée par passage successif sur le milieu COS

Milieux

- Brain Heart Infusion Broth (BHI-B), n° code : 4012302, n° lot : 4F4303, Biolife, Milano, Italy
- Nutrient Agar (NA), n° code: 4018102, n° lot: 3P2003, Biolife, Milano, Italy
- Nutrient Broth (NB), n° code: 401815, n° lot: 7E4801, Biolife, Milano, Italy
- M.Y.P. Agar, n° code: CM0929, n° lot: 369832, Oxoid, Hampshire, England
- Columbia Agar + 5% sheep blood (COS), n° code: 43 041, n° lot: 806692601, Biolife, Milano, Italy
- Sporulation Agar (AK), n° code: 4020701, n° lot: 6L1502, Biolife, Milano, Italy
- Tryptic Soy Agar (TSA), n° code: 4021502, n° lot: 5D4502, Biolife, Milano, Italy
- Manganese(II)-sulfate Monohydrate (MnSO₄ · H₂O), n° code: 63555, n° lot: 285625 1289, Fluka, Buchs

- Campden Agar à préparer selon le mode opératoire fourni par Nestlé Konolfingen, dont le résumé se trouve en annexe 1, et composé de:
 - Tryptic digest of casein, n° code: 412340, n° lot: 3E1423, Biolife, Milano, Italy
 - Bacto™ Peptone, n° code: 0118-17, n° lot: 139232XA, Difco, Basel
 - Yeast Extract, n° code: 412220, n° lot: 4H1855, Biolife, Milano, Italy
 - D(+)-Glucose Monohydrat PH.EUR.III, n° code : 203140.0914, n° lot : 83140RJP, Panreac Quimica SA, Montcada i Reixac, Spain
 - Beef Extract Powder, n° code : 41125, n° lot : 3F2738, Biolife, Milano, Italy
 - Manganese(II)-sulfate Monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), n° code: 63555, n° lot: 285625 1289, Fluka, Buchs
 - Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), n° code: 21100, n° lot: 31870/1 99 2, Fluka, Buchs
 - Agar Bacteriological (Agar Bios Special LL), n° code: 4110302, n° lot: 5M1910, Biolife, Milano, Italy

Produits chimiques

- Chlorure de sodium (NaCl), n° EC: 2315983, n° lot: 41460 34704C02, Fluka, Buchs
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), n° code : 60220, n° lot 23300, Fluka, Buchs
- di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4), n° code : 71642, n° lot : 302748 1290, Fluka, Buchs
- Lysozyme Molecular Biology grade, n° code: 9001-63-2, n° lot: 3Z07982, AppliChem Biochemica, Darmstadt, Germany
- Acétone chimiquement pur ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), n° code : E 200-662-2, n° lot : CAS 67-64-1, Pharmacochimie SA Cortaillod, Delémont
- Ethanol absolu A15O 2% cétone technique ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), n° code: TEC 6045.5, Lavanchy Chimie, Prilly
- Acide chlorhydrique (HCl), n° code : 181021.1211, n° lot : 71494CBP, Panreac Quimica, Barcelona, Spain
- Glycérine 98% 1.26 d, n° article, TEC 6090.5, Lavanchy Chimie, Prilly

Produits alimentaires

- Semoule de maïs moyenne, n° article : 6216825, n° lot : 260404070755(3), Gaefliger AG, Herzogenbuchsee
- Sel alimentaire, aucune référence disponible
- Huile de tournesol, sans n° de référence, Florin AG, Muttentz
- Sucre blanc de cuisine, sans n° de référence, Aarberg

Equipements et appareillages

- Etuve Memmert BE 500, Hettich AG (incubation à 30 °C et 37 °C), précision : ± 0.1 °C
- Balance Sartorius, BL 3100, n° appareil : 14805194, Huber & Co AG, Reinach, précision : ± 0.1 g
- Balance Mettler, n° modèle: Toledo PM200, n° appareil: SNR L92697, précision ± 0.1 g et complétée par un système de chauffage infrarouge Mettler, n° modèle : LP16, n° appareil : SNR M10031, Mettler, Nänikon
- Ultra-thermostat Colora NB17, Müller + Drempel AG, Bülach, précision: ± 1 °C
- Centrifugeuse Universal 32R, n° modèle : AEZ2415Z, n° appareil : 02A300710526137930300, Hettich Laborapparate
- Capillaires BLAUBRAND® intraMARK de 50 μ l, n° code : 708733, n° lot : 0911628, Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Germany, précision : $\pm 0.25\%$, longueur: 12.5 cm, diamètre interne: ~ 1 mm, diamètre externe: ~ 1.5 mm
- Microscope Olympus BX 40, n° modèle : BX40F-3, n° appareil : 6J04372, Olympus optical Co. LTD
- Système pour la prise de photo microscopique, composé de:
 - Microscope Axioplan, n° modèle: 451889, n° appareil : 2263 D794470/28.6.91, Carl Zeiss AG
 - Système vidéo pour la microscopie AVT-Horn, Sony
 - Monitor Trinitron Sony, n° modèle : PMV-1442 QM, n° appareil : 2012225, Sony
 - Ordinateur muni du logiciel Image Analysis 3.1
- Sonde de température Testoterm 926, testo AG, précision : ± 0.1 °C
- pH-mètre Metrohm 691, n° modèle : 1.691.0010, n° appareil : 1F3/121, Metrohm, précision : ± 0.01
- Stylo à pointe de diamant
- Chalumeau Gastolin AUT avec :
 - Gaz propulseur : Oxygène (O₂) : bouteille de 2.5 l sur-pressurisée à 200 bar, n° article : AOMLD1P, n° lot : DOM2-248, Carbagas, Gümligen
 - Gaz combustibles : Butane/propane : bouteille de 600 ml, n° article : 62738, n° lot : 44151, Gebr. Gloor AG, Burgdorf

Machines pilotes

- Cuiseuse-Extrudeuse bi-vis Clextral BP 10, n° modèle BC 21, n° série : 5000128, année de fabrication : 1990, Clextral Firming, France

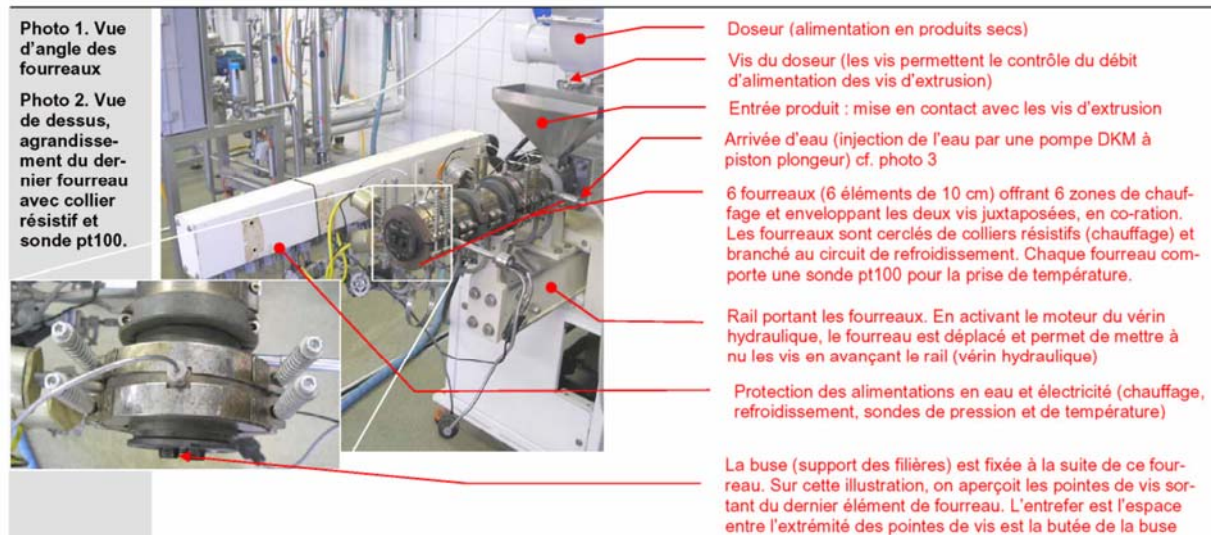


Illustration 1 : Vue d'angle des parties maîtresses de la cuiseuse-extrudeuse [23]

- Mélangeur à poudre Prodima type 50, n° modèle : AC MJ, n° appareil 50204, Prodima Pro-distribution manutention SA, Bussigny

- Tamiseur de poudre Fritsch, n° modèle : 03.592, n° appareil : 8702, Fritsch Oberstein, Germany avec tamis de diamètre nominal : 1.12 mm, 0.63 mm, 0.25 mm et 0.071 mm

2.2 MÉTHODES

2.2.1 Production

Selon protocole interne.

2.2.2 Résistance à la chaleur

La détermination de résistance à la chaleur des spores a été réalisée selon la procédure mise en place dans le travail de semestre précédant ce travail de diplôme [4] avec les modifications et précisions suivantes :

- Les capillaires provenant de la partie inférieure de pipettes Pasteur ont été remplacés par des capillaires Blaubrand®intraMARK calibrés à 50 µl.
- Les paramètres d'inactivation testés (temps et température) sont énumérés ci-dessous. Les paramètres en gras correspondent à ceux qui ont été ajoutés et qui n'étaient pas présents lors du travail de semestre.
 - 90 °C : 2, 5, 10, 20, 30, **50, 70 et 90 min**
 - 100 °C : 2, 4, 8, 12, 16, 20, **25 et 30 min**
 - 110 °C : 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, **16, 20, 25 et 30 min**
 - 120 °C : 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, **16 et 20 min**
 - **130 °C : 15 sec, 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 16 et 20 min**
 - **140 °C : 15 sec, 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 16 et 20 min**

A 90 °C, la résistance à la chaleur des spores a été testée jusqu'à 90 min, à 100 °C et 110 °C jusqu'à 30 min, à 120 °C, 130 °C et 140 °C jusqu'à 20 min. Ces temps ont été déterminés par pertinence. Tester l'inactivation jusqu'à la limite de détection de la méthode (10 spores/ml), n'est pas vraiment adapté dans le cas de ce travail de diplôme. En effet, la finalité des expériences est de tester les résistances à la chaleur dans des traitements industriels qui sont principalement de courte durée.

- Le calcul de la valeur D se fait selon la 1^{ère} formule du point 1.2.2 avec l'intervalle maximal de temps testé, sauf exception (mentionnée sous le tableau des résultats concernés).
- Le calcul de la valeur z se fait graphiquement, comme expliqué dans le point 1.2.2. L'intervalle de température considéré est 90 °C à 120 °C, sauf exception (mentionnée sous le graphique concerné), ceci afin d'avoir une cohésion entre toutes les valeurs z calculées.
- La préparation des échantillons ainsi que le dénombrement se fait selon le Manuel suisse des denrées alimentaires [24] avec les précisions et modifications suivantes :

- L'ensemencement se fait sur Nutrient Agar (NA) et la plaque est incubée pendant 18 à 24 h à 37 °C pour *B. atrophaeus* et *B. coagulans* et à 30 °C pour *B. cereus*.
- Chaque dilution est ensemencée sur 2 plaques de Petri.
- Les résultats sont communiqués avec un chiffre après la virgule.
- Une étape de nettoyage des capillaires a été ajoutée après leur passage dans le bain thermostatisé de glycérine afin d'éviter toute contamination supplémentaire. Cette étape a été inspirée de l'expérience des chercheurs du centre Nestlé de Konolfingen. Il s'agit de passages successifs dans 2 bains d'acétone à 100%, puis dans un bain composé de 10% d'acide chlorhydrique 0.1 N et de 90% d'éthanol absolu, chaque bain étant entrecoupé d'un passage dans un bain d'eau glacée.

Pour des indications plus détaillées, le mode opératoire de la détermination de la résistance à la chaleur est en annexe 2.

2.2.3 Procédés technologiques de chauffage

Plusieurs étapes sont nécessaires pour expérimenter l'inactivation de spores par cuisson-extrusion à expansion directe à savoir la préparation de la masse à extruder, le traitement thermique, la prise d'échantillon et les analyses des échantillons. Ces différents points sont développés ci-dessous et le mode opératoire détaillé est en annexe 3.

Préparation de la masse à extruder

5 kg de masse sèche (89% de semoule de maïs, 2% de sel, 1% d'huile et 8% de sucre) ont été homogénéisés à l'aide d'un mélangeur à poudre pendant 15 minutes.

D'un autre côté, 340 ml de suspension de spores de *B. atrophaeus* ont été préparés (concentration : $8.3 \cdot 10^7$ spores/ ml eau). Ces spores ont été produites selon le point 2.2.1 et la concentration voulue a été obtenue par ajout d'eau déminéralisée.

Ces 340 ml seront ajoutés aux 5 kg de masse sèche lors du processus d'extrusion, afin d'arriver à une concentration de $5.3 \cdot 10^6$ spores/g dans l'aliment juste avant traitement.

Préparation et mise en marche de la cuiseuse-extudeuse

Les vis de la cuiseuse-extrudeuse Clextal ont été montées selon le schéma mis en annexe 4 et les 6 fourreaux fixés aux températures cibles respectives de : 0, 50, 70, 120, 150 et 160 °C. Le temps de passage total dans les fourreaux est de 26 secondes, ce qui signifie un passage de 5 secondes environ pour chaque température effective des fourreaux (40 °C, 50 °C, 70 °C,

120 °C, 150 °C et 160 °C). Les autres paramètres machine ont été réglés selon les données se trouvant dans l'annexe 5. La cuiseuse-extrudeuse a ensuite été mise en marche selon les consignes de poste de la halle pilote agroalimentaire de la HEVs. [23] Les pompes à poudres ainsi qu'à eau ont dû être calibrées. Les graphiques de calibration se trouvent dans l'annexe 6.

La première heure de l'essai a été réalisée avec de l'eau non contaminée, afin de pouvoir stabiliser la machine. Ensuite, de l'eau contaminée a été introduite ($8.3 \cdot 10^7$ spores/ml eau).

Prise d'échantillons

Avant le traitement thermique, 2 échantillons de 100 g de la masse sèche à extruder ont été prélevés.

Après le traitement thermique, la prise d'échantillons a commencé une fois que l'extrudeuse eu atteint l'état stationnaire (température des fourreaux, vitesse de rotation des vis, pression à l'entrée et à la sortie, ampérage et débit ne variant pas plus de 5%) et que l'eau contaminée a été introduite. Pendant 1 heure, 6 échantillons de 40 g ont été prélevés, à 10 minutes d'intervalle les uns des autres.

Analyses microbiologiques

Les 2 échantillons prélevés avant le traitement thermique ainsi que les 6 prélevés après le traitement thermique ont été analysés microbiologiquement.

La préparation des échantillons ainsi que le dénombrement se sont faites selon le Manuel suisse des denrées alimentaires [26] avec les précisions et modifications suivantes :

- Les échantillons de masse sèche à extruder, prélevés avant le traitement thermique sont chauffés pendant 30 min à 80 °C afin de détruire toutes les bactéries végétatives présentes. En effet, seul le nombre initial de spores est pertinent.
- Chaque dilution estensemencée sur 2 plaques de Petri.
- Les résultats sont communiqués avec un chiffre après la virgule.

Analyses physiques

Toutes les analyses physiques présentées ci-dessous ont été réalisées sur le mélange avant extrusion ainsi que sur les céréales expansées obtenues après extrusion. Une exception est la granulométrie qui ne peut être réalisée que sur le mélange de poudres avant extrusion.

- Granulométrie : L'analyse de la taille des particules du mélange à extruder (semoule de maïs, sel et sucre) a été réalisée selon les directives du Manuel suisse des denrées alimentaire [25] avec la modification suivante :

- Les tamis utilisés avaient un diamètre nominal de 1.12 mm, 0.63 mm et 0.25 mm.

- Matière sèche : Le dosage de la matière sèche du mélange à extruder ainsi que des céréales expansées a été réalisé à l'aide d'une balance infrarouge et les paramètres de la balance ont été choisis suivant les recommandations pour l'analyse de la semoule de soja, de la brochure Mettler. [26] La semoule de soja peut être considérée comme le produit le proche des céréales utilisées, parmi les produits proposés par la brochure.

- Densité du mélange non extrudé : La densité du mélange non extrudé a été réalisée selon le Manuel suisse des denrées alimentaires. [27]

- Densité du mélange extrudé : La mesure de la densité du mélange extrudé a été effectuée selon une méthode interne développée par Khalid Bounoun durant son travail de diplôme en 2005. [28]

2.2.4 Choix d'un surrogate

La création d'une marche à suivre pour le choix d'un surrogate s'est réalisée selon les réflexions effectuées tout au long du travail de semestre et du travail de diplôme. Elle s'est additionnée d'une recherche de littérature de scientifiques ayant réfléchi dans ce sens, sans trouver de mode opératoire déjà établi.

3 RÉSULTATS

3.1 PRODUCTION

La production a pu démarrer une fois la méthode optimale mise en place. Pour chaque souche, un commentaire issu de l'observation de la souche lors de la sporulation suit.

B. atrophaeus

Il s'est avéré que toutes les bactéries de *B. atrophaeus* ne sporulaient pas en même temps. En effet, au fil des jours, la proportion de spores augmente régulièrement de 10% à 95% environ. Lorsque la proportion de spores atteint 95% après 4-5 jours, celles-ci prennent une couleur brun foncé. Au total 250 ml à environ 10^9 spores/ml ont pu être produits afin d'effectuer les tests capillaires de résistance à la chaleur ainsi qu'un test pilote.

B. coagulans

Les bactéries de *B. coagulans* ne sporulent pas non plus toutes en même temps. La sporulation semble se faire individuellement, depuis le milieu de la bactérie et la proportion de spores atteint 95% après 6-7 jours environ. Lors de la récolte, les spores ont un aspect filamenteux et sont de couleur brun roux. Au total, 50 ml à environ 10^8 spores/ml ont pu être produits afin d'effectuer les tests capillaires de résistance à la chaleur.

B. cereus DSM 31

Après 4-5 jours d'incubation de *B. cereus* DSM 31 sur différents milieux un début de sporulation par les pôles était apparent. Cependant, aucune véritable spore n'est apparue après 15 jours à 30 °C et à 37°C sur les milieux testés, à savoir : Nutrient Agar (NA) de Biolife supplémenté d'1 ppm de sulfate de manganèse, Sporulation Agar (AK) de Biolife, Tryptic Soy Agar (TSA) de Biolife, Tryptic Soy Agar (TSA) de Biolife supplémenté de 0.05 mg/l de sulfate de manganèse et Campden Agar (CA). L'illustration suivante présente des bactéries qui semblent être bloquées au stade de début de sporulation, après 1 mois d'incubation à 37 °C sur Campden Agar (CA).



Illustration 2 : *B. cereus* DSM 31 après 1 mois d'incubation à 37 °C sur Campden Agar (CA)

L'illustration 2 montre que la bactérie commence à concentrer ses substances nutritives. Des pseudo spores formées par invagination de la membrane plasmique sont apparentes. Cependant, le cours habituel de la sporulation ne se poursuit pas puisque la cellule reste bloquée à cette étape, même après 1 mois d'incubation sur un milieu spécifique pour la formation de spores.

B. cereus wild type

Les bactéries de *B. cereus* wild type ne sporulent pas non plus toutes en même temps mais par groupe de 4-5 bactéries accolées les unes aux autres et formant une sorte de fil. La sporulation semble se faire depuis les extrémités de la bactérie et la proportion de spores atteint 95% après 4-5 jours environ. Lors de la récolte, les spores ont un aspect blanc laiteux et visqueux. Au total, 30 ml à environ 10^8 spores/ml ont pu être produit afin d'effectuer les tests capillaires de résistance à la chaleur.

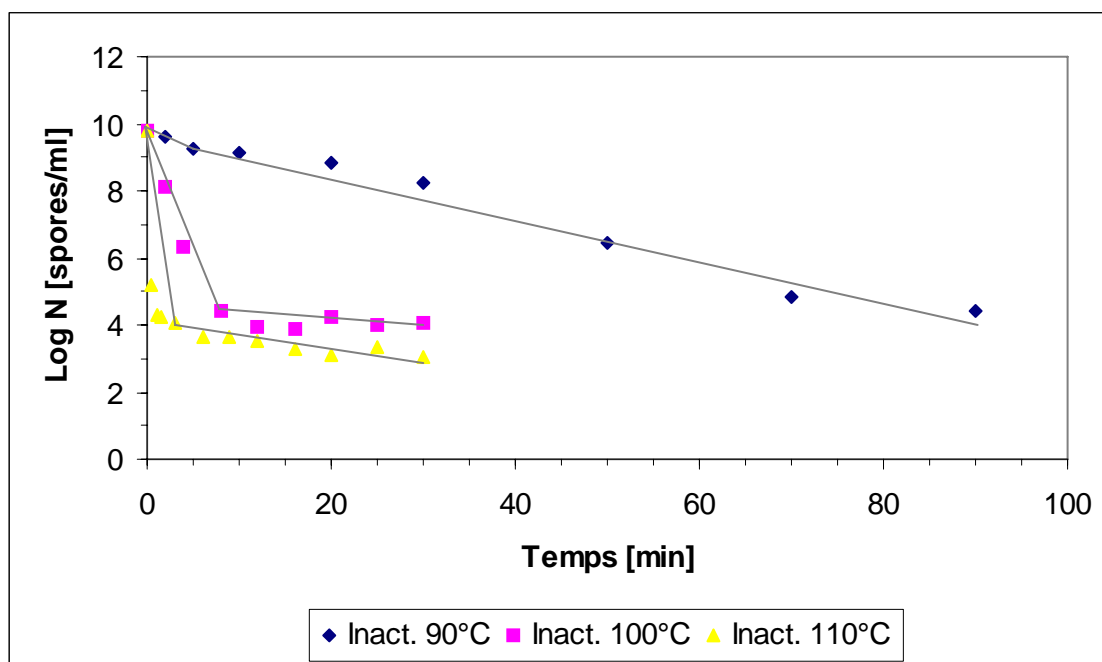
3.2 RÉSISTANCE À LA CHALEUR

Après s'être assuré que les solutions de spores produites ne contenaient bien que des spores (aucune cellule végétative décelable au microscope) et que la température indiquée par le bain-marie était correcte (à ± 1 °C), les expériences de détermination de la résistance à la chaleur par méthode capillaire ont débuté.

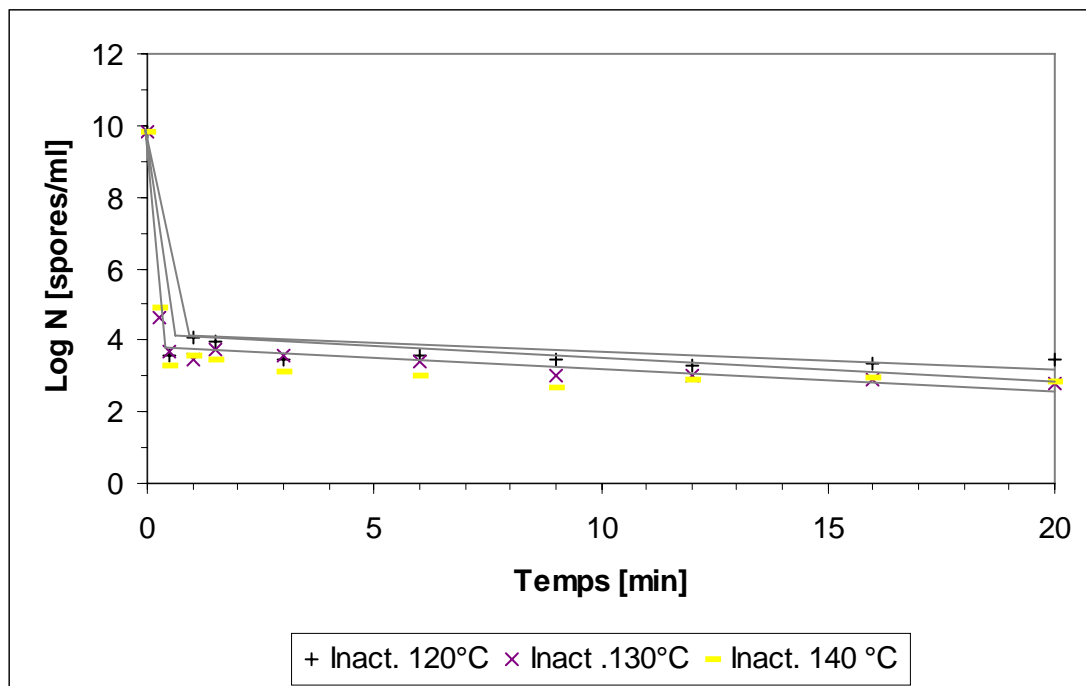
3.2.1 *B. atrophaeus*

Répétabilité et limite de la méthode

Pour qu'une méthode puisse être fiable, il faut que sa reproductivité ainsi que sa répétabilité soient bonnes. La reproductivité doit être testée au moins par deux personnes ou laboratoires différents et n'a donc pas pu être mise à l'épreuve dans ce travail de diplôme. La répétabilité a par contre été testée puisque la résistance à la chaleur des spores de *B. atrophaeus* produites dans le cadre de ce travail de diplôme a été expérimentée à triple. Les 2 graphiques suivants présentent pour chaque couple temps-température, la moyenne des 3 résultats obtenus.



Graphique 1 : Inactivation des spores de *B. atrophaeus*, produites lors de ce travail de diplôme, à 90 °C, 100°C et 110 °C



Graphique 2 : Inactivation des spores de *B. atrophaeus*, produites lors de ce travail de diplôme, à 120 °C, 130 °C et 140 °C

Les graphiques 1 et 2 montrent l'inactivation des spores à différentes températures de chauffage. De manière générale, le nombre de spores survivantes diminue avec une augmentation de la température, même si les courbes à 110 °C, 120 °C, 130 °C et 140 °C se chevauchent relativement.

L'inactivation à 90 °C semble posséder un caractère linéaire sur un graphique à échelle semi-logarithmique, alors qu'à 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C et 140 °C l'inactivation est clairement exponentielle décroissante ou linéaire en 2 phases. Afin de pouvoir calculer les valeurs D et z et par soucis de cohésion, il a été choisi de considérer pour toutes les températures, le caractère linéaire en 2 phases.

On remarque que la durée de la première phase diminue lorsque la température augmente. En effet, pour 90 °C et 100 °C elle a été déterminée comme allant jusqu'à 5-10 min environ, pour 110 °C jusqu'à 2-3 min, pour 120 °C jusqu'à 1 min et pour 130 °C et 140 °C jusqu'à 30 secondes environ.

Chaque point des 2 graphiques précédents représente la moyenne de 3 essais. A chacun de ces points correspond donc un écart-type. Les écart-types sont compris entre 1% et 15%. 45% des écarts-types sont inférieures à 5% et 55% sont compris entre 5% et 15%.

Fiabilité des valeurs D et z, traînées et influences

Afin de pouvoir quantifier les résistances de chaque phase de l'inactivation des 2 graphiques précédents, les valeurs de réduction décimale D ont été calculées en utilisant la 1^{ère} formule du point 1.2.2. Les valeurs relatives à la 1^{ère} phase ont été reportées dans le tableau 1 alors que celles relatives à la 2^{ème} phase ont été reportées dans les tableaux 2 et 3. Pour le tableau 2, les valeurs D ont été calculées avec les temps maximaux testés alors que pour le tableau 3, des temps plus courts (les mêmes que ceux choisis dans le travail de semestre) ont été pris en compte.

Tableau 1 : Valeur de réduction décimale D pour la phase 1, de 90 °C à 140 °C, des spores de *B. atrophaeus* produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	90	100	110	120	130	140
Valeur D de la phase 1 [min]	8.3	1.5	0.3	0.2	0.1	0.1

Tableau 2 : Valeur de réduction décimale D pour la phase 2 « longue », de 90 °C à 140 °C, des spores de *B. atrophaeus* produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	90	100	110	120	130	140
Valeur D de la phase 2 longue [min]	17.7	55.0	23.8	27.1	11.0	9.4

Remarque : Pour 90 °C, l'intervalle de temps pris en compte pour le calcul de la valeur D est de 90 min, pour 100 °C et 110 °C : 30 min, pour 120 °C, 130 °C et 140 °C : 20 min.

Tableau 3 : Valeur de réduction décimale D pour la phase 2 « courte », de 90 °C à 140 °C des spores de *B. atrophaeus* produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	90	100	110	120	130	140
Valeur D de la phase 2 courte [min]	25.0	13.3	16.4	13.8	7.3	5.9

Remarque : Pour 90 °C, l'intervalle de temps pris en compte pour le calcul de la valeur D est de 30 min, pour 100 °C : 20 min, pour 110°C, 120 °C, 130 °C et 140 °C : 12 min.

De manière générale, les tableaux 1, 2 et 3 montrent que les valeurs D diminuent avec une augmentation de la température. Cette constatation est plus claire pour la phase 1 (tableau 1) que pour la phase 2 (tableaux 2 et 3). Les valeurs D de la 1^{ère} phase sont toujours inférieures à leur valeur D correspondante de la 2^{ème} phase. Les valeurs de la phase 2 calculées avec un intervalle de temps plus grand (tableau 2) sont toujours plus élevées que celles calculées avec un intervalle de temps plus court (tableau 3), excepté pour 90 °C.

Afin de pouvoir quantifier l'écart de température requis pour faire varier la réduction thermique de 90% (valeur z), il est nécessaire de représenter graphiquement les valeurs D en fonction de la température. Ensuite, il faut linéariser les points obtenus et l'inverse de la pente de l'équation de chaque droite donne la valeur z . En effet, cette valeur représente l'écart de température requis pour obtenir une diminution d'une unité logarithmique. Les courbes de régression nécessaires à l'obtention de la valeur z se trouvent sur le graphique 1 de l'annexe 7.

Les valeurs z obtenues se retrouvent dans le tableau suivant. Elles seront toujours données sans chiffre après la virgule, puisque les coefficients de linéarisation des graphiques de l'annexe 7 prouvent que leur précision n'est pas toujours optimale.

Tableau 4 : Valeur z des spores de *B. atrophaeus* produites lors de ce travail de diplôme, selon la phase d'inactivation

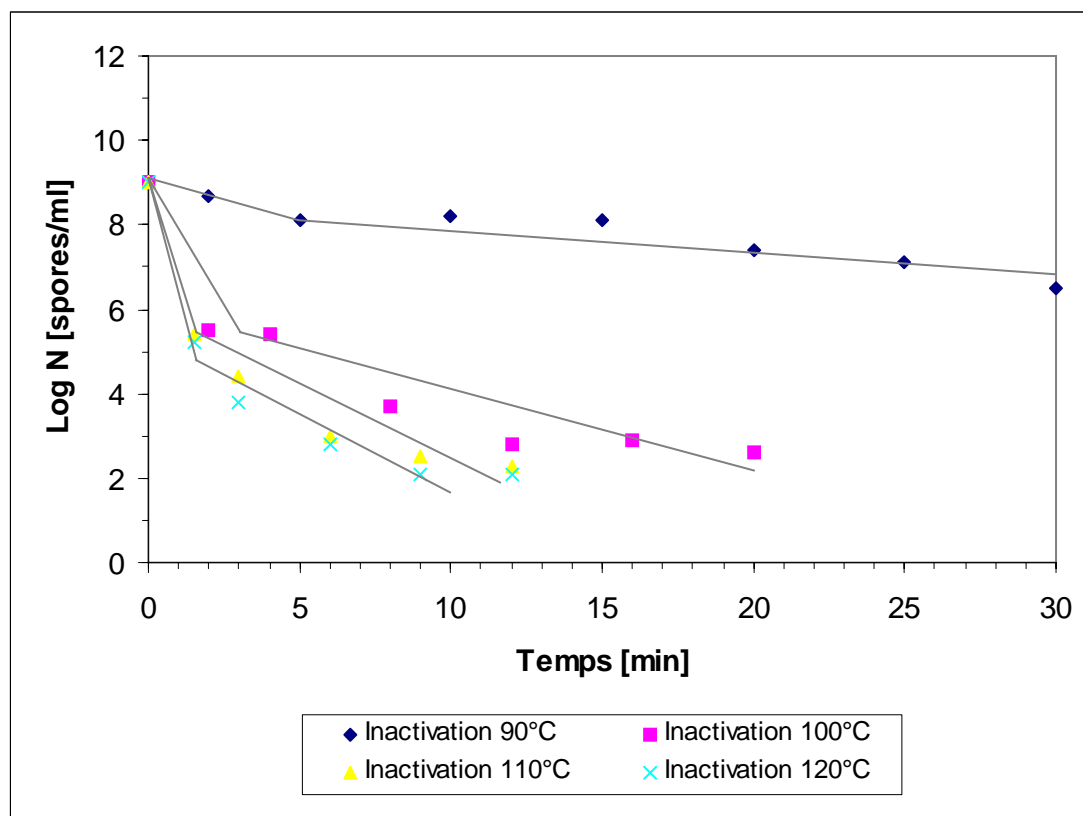
	phase		
	1	2 longue	2 courte
Valeur z [°C]	17	108	95

Le tableau 4 montre que la diminution de la résistance en fonction d'une augmentation de la température se fait plus rapidement pour la phase 1 que pour la phase 2 puisque $17 < 108$ et 95 . On observe aussi que la valeur z diffère selon l'intervalle de temps considéré pour son calcul. En effet, si on calcul la valeur z de la phase 2 avec des intervalles de temps plus longs on arrive à 108 tandis qu'avec des intervalles de temps plus courts on obtient 95.

Stabilité des spores de *B. atrophaeus* stockée à 4 °C dans du tampon phosphate

Ce paragraphe traite de la résistance à la chaleur des spores de *B. atrophaeus* produites par Federica Milani en 2005 et stockées dans du tampon phosphate à 4 °C. [1] La résistance à la chaleur a été déterminée à l'aide de la méthode capillaire environ 6 mois (lors du travail de semestre) et 12 mois après leur production (lors de ce travail de diplôme).

Le graphique suivant illustre l'inactivation des spores 6 mois après leur production et stockage dans du tampon phosphate à 4 °C.



Graphique 3 : Inactivation des spores de *B. atrophaeus* de 90 °C à 120 °C 6 mois après leur production par Federica Milani en 2005 [4]

Le graphique 3 montre l'inactivation des spores à différentes températures de chauffage. On remarque qu'il existe 2 phases d'inactivation et que le nombre de spores survivantes diminue avec une augmentation de la température. L'inactivation se fait de manière assez régulière, mis à part quelques sauts à 100 °C. Les pentes semblent être de plus en plus raides, plus la température augmente.

Pour quantifier les résistances des 2 phases de l'inactivation, les valeurs D ont été calculées selon la formule du point 1.2.2 et reportées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Valeur de réduction décimale D de 90 °C à 120 °C des spores de *B. atrophaeus* , 6 mois après leur production par Federica Milani en 2005 [4]

	Température [°C]							
	90		100		110		120	
phase	1	2	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	5.6	15.6	1.1	5.7	0.7	4.3	0.6	5.3

Le tableau 5 montre que de manière générale, pour chaque phase, la valeur D diminue lorsque la température augmente. Pour chaque température, la valeur de la phase 1 est toujours inférieure à celle de la phase 2.

Comme au point précédent, on peut exprimer le logarithme des valeurs D obtenues en fonction de la température afin de déterminer la valeur z associée à chaque phase. A partir des droites de régression linéaire du graphique 2 de l'annexe 7, on peut trouver la valeur z associée à chaque phase.

Les valeurs z obtenues (inverse de la pente des droites) se résument dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Valeur z des spores de *B. atrophaeus* 6 mois après leur production par Federica Milani en 2005, selon la phase d'inactivation [4]

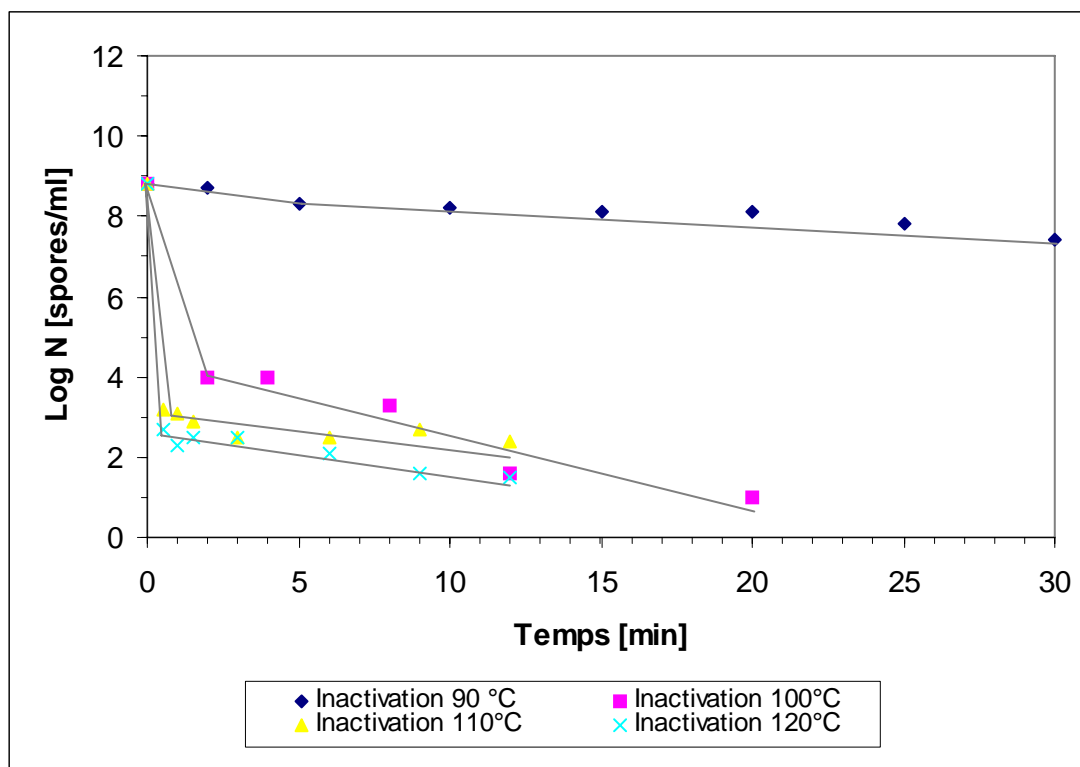
	phase	
	1	2
Valeur z [°C]	32	65

Le tableau 6 montre que la diminution de la résistance lors d'une augmentation de température se fait plus rapidement dans la phase 1 que dans la phase 2 puisque $32 < 65$.

Lors de ce travail de diplôme, c'est à dire 12 mois après la production des spores de *B. atrophaeus*, l'expérience a été réitérée. L'inactivation thermique de la même solution de spores a été testée aux mêmes paramètres temps et température que lors du travail de semestre. Quelques modifications ont cependant été apportées à la méthode :

- une étape de lavage es capillaires a été introduite, conformément au point 2.2.2
- les capillaires provenant de la partie inférieure de pipettes Pasteur ont été remplacés par des capillaires de 50 µl. Le diamètre extérieur des 2 sortes de capillaires est identiques alors que le diamètre intérieur ne l'est pas. La paroi de la deuxième sorte de capillaires est environ 2 fois plus épaisse.

Les résultats de l'inactivation après 12 mois de production sont présentés dans le graphique suivant.



Graphique 4 : Inactivation des spores de *B. atrophaeus*, de 90 °C à 120 °C, 12 mois après leur production par Federica Milani en 2005

Le graphique 4 montre que la courbe de survie des spores est biphasique. A 90 °C elle semble être relativement régulière alors qu'à 100 °C, 110 °C et 120 °C elle est plus chaotique. L'augmentation de la pente lors de l'augmentation de la température est visible pour la 1^{ère} phase, mais pas pour la 2^{ème}. Les valeurs D ont cependant pu être calculées à partir de ce graphique et selon la formule du point 1.2.2. Elles se retrouvent dans le tableau suivant.

Tableau 7 : Valeur de réduction décimale D de 90 °C à 120 °C des spores de *B. atrophaeus*, 12 mois après leur production par Federica Milani en 2005

	Température [°C]							
	90		100		110		120	
phase	1	2	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	10	27.8	0.2	19	0.1	14.4	0.1	9.6

Comme au point précédent, on peut exprimer le logarithme des valeurs D obtenues en fonction de la température afin de déterminer la valeur z associée à chaque phase. Les valeurs z de la phase 1 et 2 trouvées à l'aide du graphique 3 de l'annexe 7 se retrouvent dans le tableau suivant.

Tableau 8 : Valeur z des spores de *B. atrophaeus* 12 mois après leur production par Federica Milani en 2005, selon la phase d'inactivation

	phase	
	1	2
Valeur z [°C]	16	77

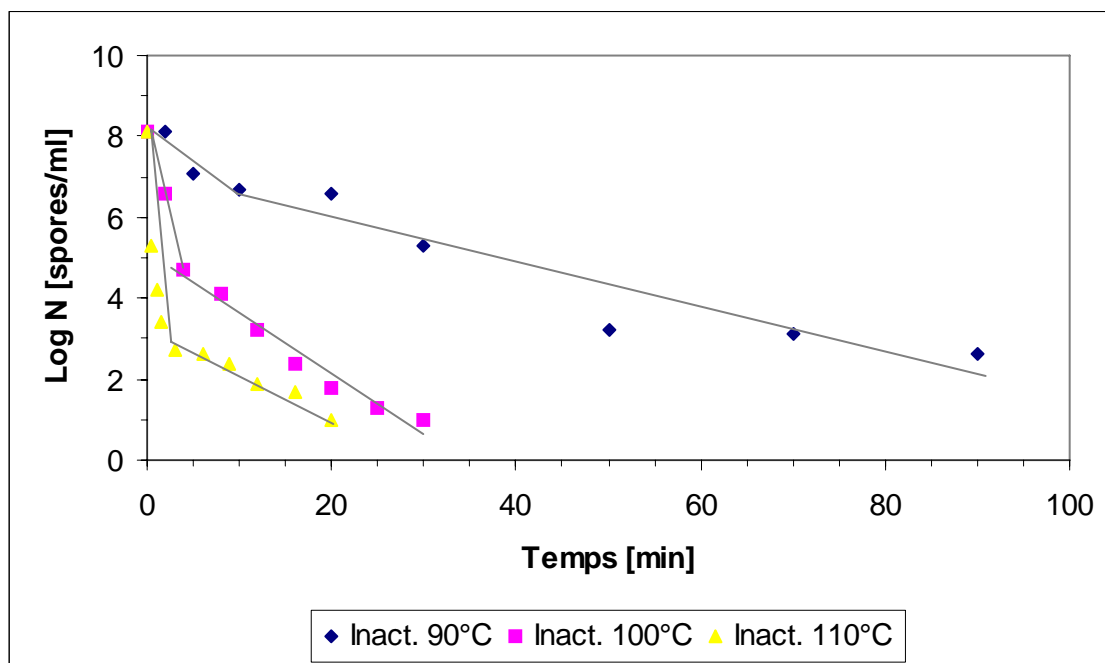
Le tableau 8 montre que la diminution de la résistance lors d'une augmentation de température se fait plus rapidement dans la phase 1 que dans la phase 2 puisque $16 < 77$.

Un des objectifs de ce travail de diplôme est de comparer, par méthode capillaire, les valeurs de résistance à la chaleur des spores de *B. atrophaeus*, *B. coagulans* et *B. cereus*.

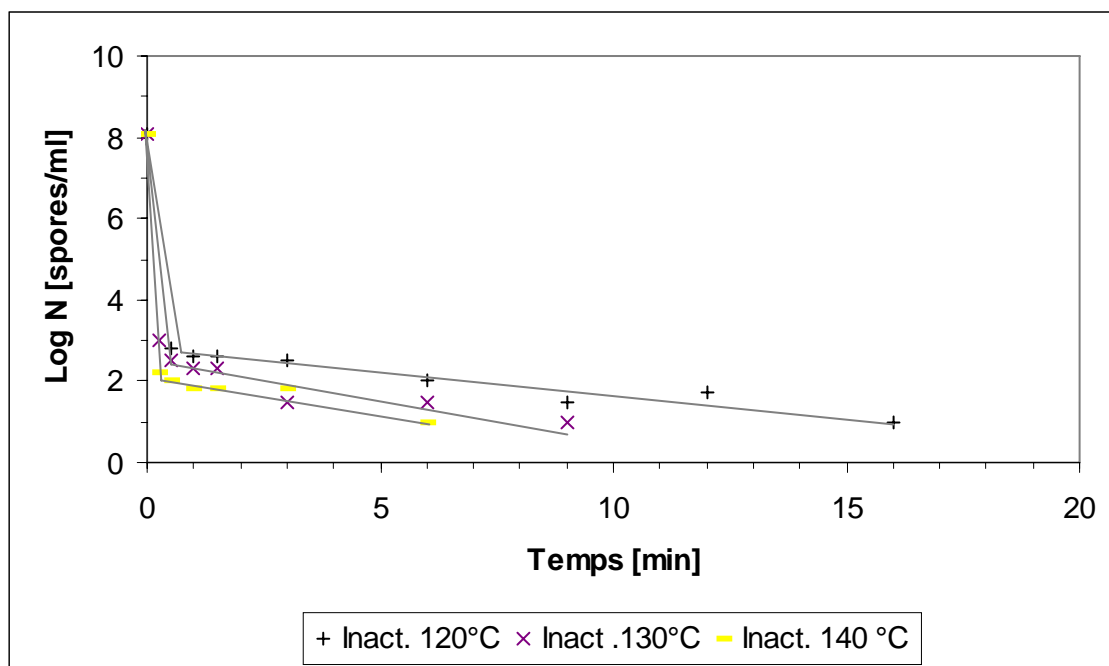
Les deux points suivants présenteront donc de la même manière que pour *B. atrophaeus*, les résultats de la résistance à la chaleur de *B. coagulans* et *B. cereus*.

3.2.2 *B. coagulans*

Les résultats des tests d'inactivation à la chaleur par méthode capillaire de *B. coagulans* se trouvent dans les deux graphiques suivants.



Graphique 5 : Inactivation des spores de *B. coagulans*, produites lors de ce travail de diplôme, à 90 °C, 100°C et 110 °C



Graphique 6 : Inactivation des spores de *B. coagulans*, produites lors de ce travail de diplôme, à 120 °C, 130 °C et 140 °C

Remarque : Afin d'alléger et de clarifier les graphiques 5 et 6, les points (110 °C/25 min), (110 °C/30 min), (120 °C/ 20 min), (130 °C/12 min), (130 °C/16 min), (130 °C/20 min), (140 °C/9 min), (140 °C/12 min), (130 °C/16 min) et (130 °C/20 min) n'ont pas été représentés puisque la limite de détection de 10 spores/ml est déjà atteinte dans ces cas particuliers.

Les graphiques 5 et 6 montrent que la courbe de survie des spores chauffées à 90 °C pourrait esquisser le caractère d'une inactivation en 1 phase. Cependant, au fur et à mesure que la température augmente, il devient clair que l'inactivation ne peut pas être monophasique. Une inactivation en 2 phases a donc été tracée pour chaque température. Il est visible que le nombre des spores survivantes diminue régulièrement lors de l'augmentation de la température. Les 2 graphiques montrent aussi que la précision des points semble bonne puisque presque aucune courbe ne se chevauche.

Pour chaque température et chaque phase des 2 graphiques précédents, les valeurs D ont été calculées selon la formule du point 1.2.2. Elles se retrouvent dans les 2 tableaux suivants.

Tableau 9 : Valeur de réduction décimale D de 90 °C à 110 °C des spores de *B. coagulans* produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	90		100		110	
phase	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	7.1	19.5	1.2	7.0	0.3	7.7

Tableau 10 : Valeur de réduction décimale D de 120 °C à 140 °C des spores de *B. coagulans* produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	120		130		140	
phase	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	0.2	9.4	0.1	5.7	0.1	4.8

Les 2 tableaux précédents confirment la tendance dans chaque phase de la diminution de la valeur D lors de l'augmentation de la température. Les valeurs de la phase 2 de 110 °C et 120 °C font cependant exception.

A partir des valeurs des 2 tableaux précédents, on peut tirer graphiquement, comme expliqué sous le point 1.2.2, les valeurs z collectées dans le tableau suivant.

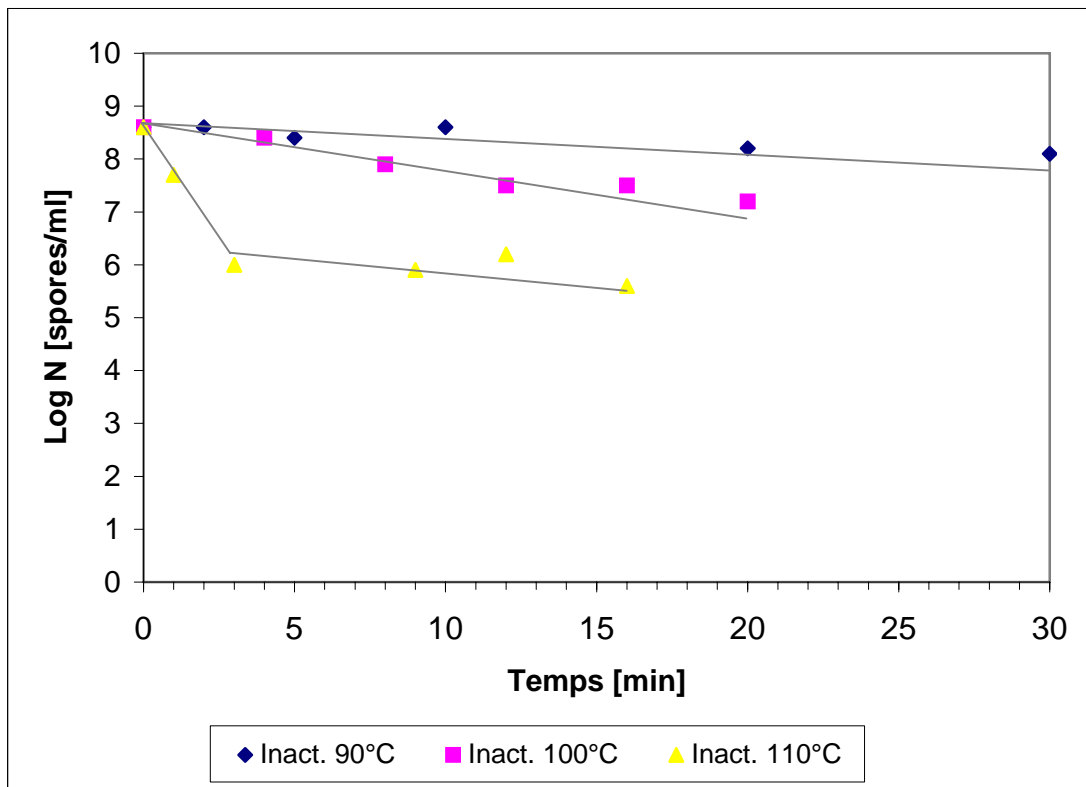
Tableau 11 : Valeur z des spores de *B. coagulans* produites lors de ce travail de diplôme, selon la phase d'inactivation

	phase	
	1	2
Valeur z [°C]	15	50

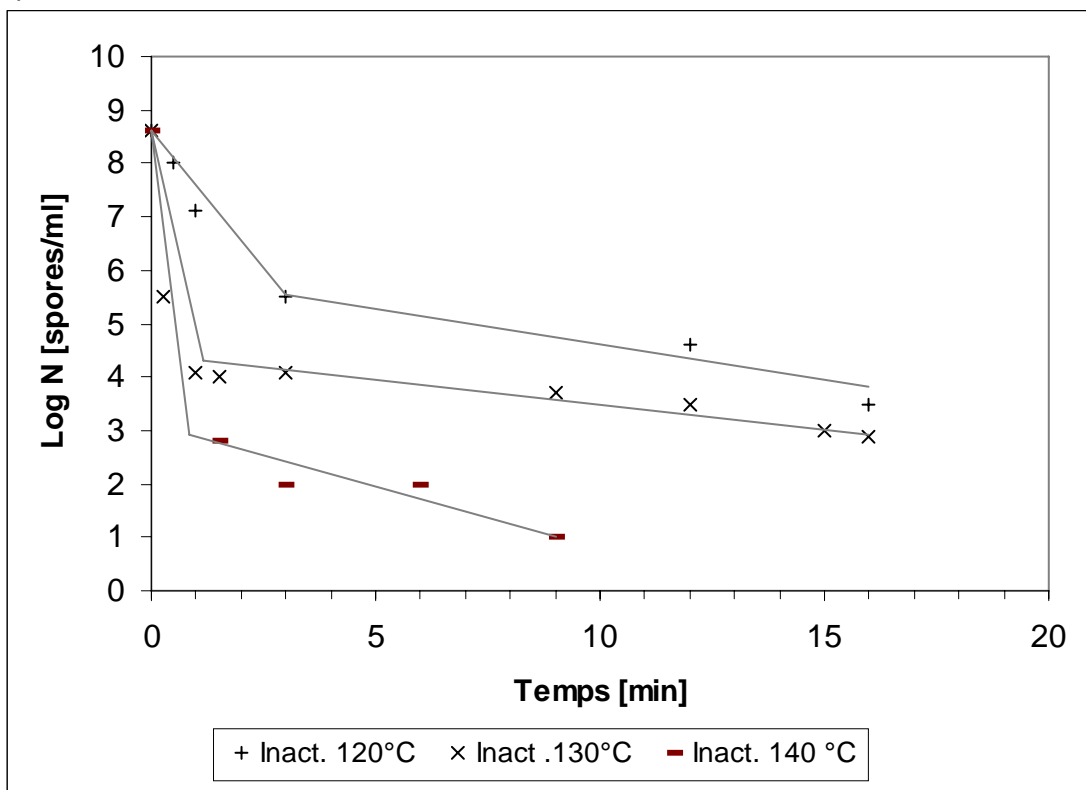
Le tableau 11 montre que la diminution de la résistance lors d'une augmentation de température se fait plus rapidement dans la phase 1 que dans la phase 2 puisque $15 < 50$.

3.2.3 *B. cereus*

De même que pour *B. atrophaeus* et *B. coagulans* les tests d'inactivation par méthode capillaire vis-à-vis de la chaleur ont été réalisés sur *B. cereus* wild type. Les résultats se trouvent dans les deux graphiques suivants.



Graphique 7 : Inactivation des spores de *B. cereus* wild type, produites lors de ce travail de diplôme, à 90 °C, 100°C et 110 °C



Graphique 8 : Inactivation des spores de *B. cereus* wild type, produites lors de ce travail de diplôme, à 120 °C, 130°C et 140 °C

Remarque : Afin d'alléger et de clarifier le graphique 8, les points (140 °C/12 min), (140 °C/16 min) et (140 °C/ 20 min) n'ont pas été représentés puisque la limite de détection de 10 spores/ml est déjà atteinte dans ces cas particuliers.

Faute de temps, tous les paramètres temps/température n'ont pas pu être testés

Les graphiques 7 et 8 montrent que l'inactivation des spores de *B. cereus* augmente avec le temps et la température de chauffage. Cette augmentation semble se faire de manière régulière puisque l'intervalle entre les courbes est assez uniforme. L'augmentation de la pente de la 1^{ère} phase avec l'augmentation de la température est aussi visible. Les courbes de 90 °C et 100 °C semblent posséder un caractère linéaire d'inactivation en une phase alors que pour les autres températures, on décèle 2 phases.

Pour chaque température et chaque phase des 2 graphiques précédents, les valeurs D ont été calculées selon la formule du point 1.2.2. Elles se retrouvent dans les 2 tableaux suivants.

Tableau 12: Valeur de réduction décimale D de 90 °C à 110 °C des spores de *B. cereus* wild type, produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]			
	90		100	
phase	1 et 2		1 et 2	
Valeur D [min]	60.0		21.4	

Remarque : Une seule valeur D a été calculée pour 90 °C et 100 °C puisqu'une seule phase est distinguable sur le graphique 7.

Tableau 13 : Valeur de réduction décimale D de 120 °C à 140 °C des spores de *B. cereus* wild type, produites lors de ce travail de diplôme

	Température [°C]					
	120		130		140	
phase	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	1.0	6.5	0.3	13.2	0.3	4.2

De manière générale, les tableaux 12 et 13 montrent que les valeurs D diminuent avec une augmentation de température. A partir des valeurs des 2 tableaux précédents on peut tirer graphiquement, comme expliqué sous le point 1.2.2, les valeurs z collectées dans le tableau suivant.

Tableau 14 : Valeur z des spores de *B. cereus* wild type, produites lors de ce travail de diplôme, selon la phase d'inactivation

	phase	
	1	2
Valeur z [°C]	15	37

Le tableau 14 montre que la diminution de la résistance en fonction d'une augmentation de température se fait plus rapidement pour la phase 1 que pour la phase 2 puisque 15 < 37.

3.3 PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES DE CHAUFFAGE

La résistance à la chaleur d'un surrogate potentiel de *B. cereus* a ensuite été testée non plus dans du tampon phosphate, mais en « condition réelle ». Pour ceci, une certaine quantité de spores de *B. atrophaeus* a été ajoutée à un mélange de départ, composé en grande partie de semoule de maïs, qui a subi un traitement de cuisson-extrusion. A la sortie de l'extrudeuse, on a récolté des céréales expansées, dont la teneur en spores a été analysée. Les points suivants présentent les caractéristiques du produit obtenu (analyses physiques) ainsi que l'influence du traitement sur la vitalité des spores (analyses microbiologiques).

3.3.1 Analyses physiques

L'illustration suivante présente les céréales expansées obtenues.

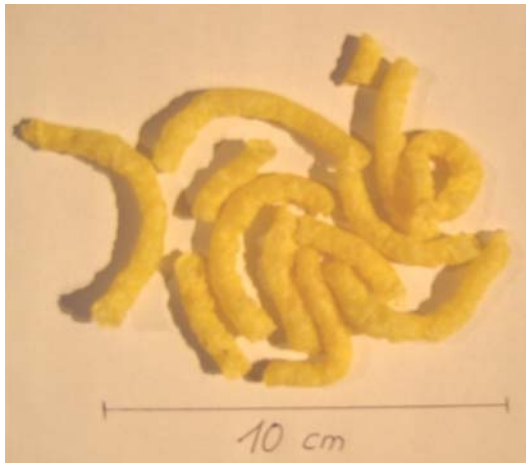
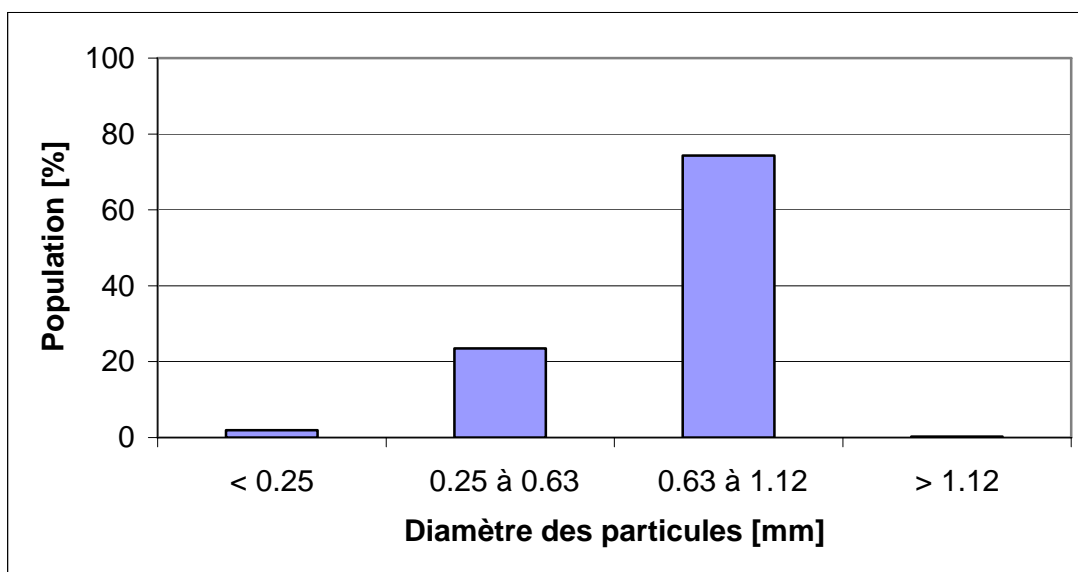


Illustration 3 : Céréales de maïs expansées à la sortie de l'extrudeuse

Ces céréales ainsi que le mélange dont elles proviennent ont été caractérisés par des analyses physiques, présentées dans le graphique et le tableau qui suivent. Le graphique suivant présente la répartition des grains du mélange de départ en fonction de leur diamètre.



Graphique 9 : Résultats de l'analyse granulométrique du mélange (semoule, sucre et sel) à extruder

Le graphique 9 montre que le 75 % des grains qui ont été extrudés possédaient un diamètre compris entre 0.63 mm et 1.12 mm et que tous les grains avaient un diamètre compris entre 0.25 mm et 1.12 mm.

Le tableau suivant présente les résultats de l'analyse de la matière sèche et de la densité du mélange (semoule, sel, sucre, huile et eau) avant et après extrusion.

Tableau 15 : Résultats des analyses physiques effectuées sur le produit, avant et après extrusion

	Avant extrusion	Après extrusion
Matière sèche [%]	86.6 ± 0.1	91.9 ± 0.1
Densité [g/cm³]	7.7 g ± 0.1	0.20 ± 0.01

Le tableau 15 montre l'influence du processus d'extrusion sur la matière sèche et la densité du produit. On peut voir que les céréales expansées obtenues ont une matière sèche plus élevée d'environ 5% et une densité environ 40x plus faible.

Des analyses microbiologiques ont été réalisées en parallèle. Leurs résultats sont présentés dans le point suivant.

3.3.2 Analyses microbiologiques

Le tableau suivant montre la diminution de la population de spores suite au passage dans l'extrudeuse.

Tableau 16 : Résultats des analyses microbiologiques effectuées avant et après passage dans l'extrudeuse

	N ₀ [spores/g] (avant passage dans l'extrudeuse)	N _t [spores/g] (après passage dans l'extrudeuse)	Valeur D maximale [min]
Spores de <i>B. atrophaeus</i> (produites lors de ce travail de diplôme)	5.3 · 10 ⁶	< 10	0.08

Remarques : L'analyse de la semoule de maïs, du sucre et du sel avant extrusion n'a détecté aucune spore dans 20 g (limite de détection de la méthode : 10 spores/g). Le nombre initial de spores N₀ correspond donc bien uniquement aux spores injectées artificiellement.

La valeur D communiquée par le tableau ci-dessus est une valeur maximale. En effet, pour déterminer sa valeur exacte, il faudrait augmenter la valeur N₀ jusqu'à ce que N_t dépasse la limite de détection de 10 spores/g.

La valeur z n'a pas pu être calculée puisque le paramètre « température maximale des fourreaux » n'a pas pu être varié.

Les valeurs N₀ et N_t du tableau 16 indiquent que les spores de *B. atrophaeus* ont subi une réduction d'au moins 5D lors du passage dans l'extrudeuse. Ces valeurs, ainsi que le temps de passage connu de 26 secondes pour l'ensemble des fourreaux permettent de calculer une valeur D de 0.08 min au maximum. Cette valeur D est valable pour un passage d'environ 5 secondes par fourreau dont les températures effectives sont : 40 °C, 50 °C, 70 °C, 120 °C, 150 °C et 160 °C.

3.4 CHOIX D'UN SURROGATE

Un surrogate est d'une grande utilité, puisqu'il permet de remplacer un pathogène afin d'effectuer des expériences sans risque pour la santé des collaborateurs. Le choix du surrogate est une étape critique qui doit être effectuée méthodiquement. En effet, une trop grande précipitation et l'utilisation d'un surrogate non adapté engendrerait des erreurs et une grande perte de temps et d'argent. Pour ceci, un mode opératoire a été établi afin de structurer le choix.

Ce mode opératoire est censé aider le scientifique à répondre à la question suivante : « Quel surrogate de pathogène utiliser en fonction d'un traitement et d'un produit à traiter ? »

1. Observation de la situation

Si le pathogène à substituer est déjà défini, passer directement au point 2. En effet, les 2 étapes de ce point 1 permettent de déterminer le pathogène concerné si l'on ne connaît que l'aliment et le traitement appliqué. Il s'agit de :

- Déterminer les pathogènes susceptibles d'être présent dans le produit à traiter selon les suspicions, les expériences préalables de l'entreprise ou les connaissances actuelles (pour les aliments, s'aider de livres tels que « Microorganisms in foods 6, second edition, microbial ecology of food commodities » de l'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Kluwer Academic /Plenum Publishers, 2005).
- Parmi les microorganismes considérés, sélectionner le plus résistant au(x) traitement(s) appliqué(s). Par exemple :
 - spores de *C. botulinum* pour la stérilisation de conserves de divers aliments
 - spores de *B. cereus* dans un lait en poudre
 - spores de *B. anthracis* dans un objet ou aliment suspecté d'être contaminé par des bioterroristes

2. Réflexions théoriques

Ce deuxième point consiste, une fois le pathogène cible déterminé, à trouver un surrogate potentiel. Il faut donc :

- Etudier tout d'abord le genre auquel appartient le pathogène et recenser les espèces y appartenant. Il est en effet conseillé de sélectionner les surrogates potentiels à l'intérieur du même genre, étant donné les propriétés similaires qui les unissent et qui risqueraient de jouer un rôle lors du traitement.
- Rechercher dans la littérature les données existantes pertinentes sur le pathogène cible et les autres espèces appartenant au même genre, par exemple :
 - o Pour un traitement de réchauffement (cuisson, pasteurisation, stérilisation,...), s'intéresser au caractère des courbes d'inactivation et aux valeurs D et z de la cible et des surrogates potentiels.
 - o Pour un traitement par gaz (ozone, gaz carbonique...), rechercher la résistance des microorganismes vis-à-vis de ces différents gaz.
 - o Pour un traitement faisant intervenir des forces physiques (extrusion à froid, foisonnement, haute pression hydrostatique, irradiation, champ électrique pulsé, lumière pulsée...) s'intéresser à la résistance des surrogates potentiels vis-à-vis des forces physiques entrant en jeu.
 - o Pour des stérilisations de machines ou de surfaces de travail ayant trait à l'alimentaire, tels que stérilisation par agents chimiques par exemple, rechercher la résistance des microorganismes à ces divers agents.
- Proposer une espèce ou souche dont les caractéristiques importantes pour le traitement à appliquer s'approche le plus du pathogène.
- Vérifier que l'espèce ou la souche surrogate sélectionnée respecte bien les conditions suivantes : durabilité similaire au pathogène, caractéristiques stables, concentration élevée relativement simple à préparer, stable entre la préparation et l'usage, facilement comptable, facilement différentiable, stable génétiquement, inerte vis-à-vis des équipements ainsi que la zone de production.

3. Modélisation

Ce point permet de déterminer si le surrogate suspecté de pouvoir remplacer le pathogène est adapté. Il s'agit de :

- Tester la propriété principale de la souche surrogate et de la souche pathogène en laboratoire, avec une méthode validée.
 - o Pour un traitement de réchauffement, tester la résistance à la chaleur par méthode capillaire.
 - o Pour un traitement faisant intervenir les gaz, forces physiques et agent chimiques, tester la résistance en fonction de l'intensité et de la concentration de ces agents.
- Etudier les résultats et les comparer avec le pathogène cible.
- Décider si le surrogate est adapté pour le traitement et le pathogène considéré.
- Si le surrogate paraît adapté, passer au point 4, autrement, recommencer le point 2.

4. Validation

L'étape de validation est nécessaire pour prouver que le choix du surrogate a été correctement réfléchi, que les raisonnements sont bien fondés et que tout fonctionne de manière optimale.

Pour valider le choix d'un surrogate, il faut :

- Effectuer des tests pilotes, dans des conditions les plus proches de la réalité avec le surrogate et le pathogène afin de vérifier qu'ils ont le même comportement.
- Faire effectuer les mêmes tests laboratoires et pilotes à d'autres chercheurs compétents et comparer les résultats qui doivent correspondre.
- Conserver une trace écrite de toutes les étapes effectuées et faire approuver le document par des organismes compétents.

5. Vérification

- Contrôler que les propriétés de la souche surrogate sont stables en effectuant des contrôles continus.
- Se tenir au courant de l'évolution de la recherche pour savoir si le surrogate est toujours adapté et si un meilleur surrogate n'a pas été trouvé.
- Organiser des audits ou rencontres périodiques pour une amélioration continue.

4 DISCUSSION

4.1 PRODUCTION

Le choix d'un milieu et d'une température d'incubation qui permettent une sporulation rapide et élevée pour chaque souche de *Bacillus* utilisée dans ce travail de diplôme a nécessité de nombreuses expériences « par tâtonnement ». En effet, la méthode de production développée par Federica Milani en 2005 [1], parfaitement adaptée à la production de spores de *B. atrophaeus* n'a pas pu se transposer à la production de spores de *B. coagulans* et *B. cereus*. Pour ceci, plusieurs milieux, tels que : Nutrient Agar (NA) de Biolife supplémenté d'1 ppm de sulfate de manganèse, Sporulation Agar (AK) de Biolife, Tryptic Soy Agar (TSA) de Biolife, Tryptic Soy Agar (TSA) de Biolife supplémenté de 0.05 mg/l de sulfate de manganèse et Campden Agar (CA) ont été testés pour la sporulation de *B. coagulans* et *B. cereus*, à 30 °C et 37 °C, selon les indications de publications. [25], [17], [24], [29], [30]

Chaque souche a donc un comportement différent vis-à-vis de la sporulation, comme l'indiquent les constatations du point 3.1. Il s'est même avéré que la souche *B. cereus* DSM 31 utilisée ne sporulait pas sur les milieux testés. Une mutation s'est certainement produite dans cette souche. Le fait qu'il existerait des mutants naturels formant des spores n'arrivant jamais à maturité chez *B. cereus* est déjà connu depuis longtemps. [31] Par contre, la souche *B. cereus* wild type testée sporulait après 4-5 jours sur Campden Agar (CA) à 37 °C.

Pour *B. coagulans* DSM1 il s'est avéré que dans les mêmes conditions, certaines parties du lyophilisat reçues par DSMZ sporulaient sur Campden Agar (CA) alors que d'autres non. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'ampoule contenant le lyophilisat reçu n'était pas étanche. Un problème était donc présent à la base. Il serait donc préférable de n'accepter que des souches arrivant en bon état.

4.2 RÉSISTANCE À LA CHALEUR

La discussion de la résistance à la chaleur va se faire de la manière suivante : Les 3 premiers points seront une réflexion critique sur la fiabilité des résultats influencés par la méthode qui les fournis, la manière de calculer les valeurs D et z et la qualité des spores utilisées.

Les 3 points suivants traiteront des résultats obtenus pour chacune des 3 souches et ceux de la littérature, à savoir la droite d'inactivation, la valeur D et la valeur z.

Le dernier point clora la discussion en déterminant si les surrogates *B. atrophaeus* et *B. coagulans* proposés pour *B. cereus* sont adaptés.

4.2.1 Répétabilité et limite de la méthode

Si on observe les points des courbes des graphiques 1 et 2 on remarque qu'ils ne sont pas parfaitement alignés. Ces irrégularités peuvent être expliquées par le fait que les spores se protègent mutuellement sous forme d'agrégats très difficilement séparables, même sous forte agitation. Lorsqu'un agrégat se retrouve sur une plaque de Petri il engendre un nombre de spores anormalement élevé. En effet, selon une étude sur les spores de *B. subtilis*, les agrégats seraient en moyenne 18 à 21 fois plus résistants que les spores solitaires. [32] Ce phénomène est aléatoire, ce qui explique que les courbes d'inactivation peuvent être plus ou moins régulières.

Le graphique 2 montre que pour les intervalles de temps compris entre 15 secondes et 1 minute, les points des courbes de 120 °C, 130 °C et 140 °C ne suivent pas toujours l'ordre logiquement attendu. Ceci peut être mis sur le compte d'une perte de précision pour des intervalles de chauffage courts. En effet, une incertitude liée à l'introduction du capillaire dans le bain thermostatisé et à sa sortie aura beaucoup plus d'influence sur un temps de chauffage court que sur un long. L'optimal pour ce genre de mesure serait d'introduire une sonde de température à l'intérieur du capillaire, afin de pouvoir calculer exactement l'inactivation subie par la suspension de spores.

En observant les écarts-types des points de ces 2 graphiques, on voit que pour la moitié des mesures environ, la répétabilité est bonne puisque leurs écarts-types sont inférieurs à 5%, limite d'acceptabilité prise en général dans le domaine scientifique. Pour l'autre moitié, les écarts-types ne dépassent jamais 15%. La répétabilité totale de la méthode peut donc plus ou moins être considérée comme satisfaisante si on la ramène dans son contexte précis. En effet, les sciences du vivant, dont la microbiologie, sont des sciences où il est plus difficile d'obtenir une bonne répétabilité que dans les sciences dites exactes puisqu'elles font intervenir un facteur vivant.

Les réflexions de ce point inciteraient à dire qu'il serait préférable d'exprimer les résultats en intervalle de valeurs plutôt qu'en valeur précise.

4.2.2 Fiabilité des valeurs D et z, trainées et influences

Comme expliqué dans le point 1.2.2, il a été décidé d'utiliser encore les valeurs D et z dans ce travail de diplôme afin de pouvoir établir des comparaisons avec les publications antérieures. On peut cependant déjà observer quelques déviations dans les résultats.

En effet, si on compare les tableaux 2 et 3, on remarque que les résultats des valeurs D d'une même température sont différents, alors qu'ils devraient être similaires puisqu'il s'agit de la même expérience. La différence est à expliquer avec la formule de la valeur D.

$$D_{T^{\circ}C} = \frac{t}{\log N_0 - \log N}$$

Lorsqu'on se trouve en présence d'une traînée, par exemple pour les courbes du graphique 2, le temps de chauffage t augmente régulièrement le long de l'axe x alors que le nombre de survivants $\log N$ se stabilise. Le numérateur et le dénominateur de la fraction ci-dessus ne varient donc plus proportionnellement. Il est aisé de comprendre que plus t est grand plus $D_{T^{\circ}\text{C}}$ sera élevé. Ainsi, pour obtenir des valeurs D qui prennent en compte l'ensemble des spores testées, il faudrait expérimenter un temps t qui réduise le nombre de spores N à la limite de détection de la méthode (10 spores/ml).

La valeur z est influencée de la même manière. En effet, les résultats de la phase 2 du tableau 4 montrent que si on prend un temps de chauffage allant jusqu'à 90 min au maximum on obtient 108 au lieu de 95 pour un temps de chauffage allant jusqu'à 30 min au maximum.

Ces constatations montrent que pour les expériences réalisées dans ce travail de diplôme, le modèle utilisant les valeurs D et z n'est pas l'un des plus précis. Il est cependant très utile puisqu'il permet d'obtenir rapidement de bonnes approximations.

4.2.3 Stabilité des spores de *B. atrophaeus* stockées à 4 °C dans du tampon phosphate

En observant les graphiques 3 et 4 on remarque que les courbes de survie tracées 6 mois après la production suivent plus ou moins la même tendance que celle tracées 12 mois après la production.

Malgré cela, la différence non négligeable qu'on peut en retirer est le nombre plus élevé de spores touchées par la 1^{ère} phase d'inactivation à 100 °C, 110 °C et 120 °C après 12 mois (de $\log N_0 = 9$ à $\log N = 3.5$ en moyenne pour 12 mois contre de $\log N_0 = 9$ à $\log N = 5.5$ en moyenne pour 6 mois). Ceci veut dire qu'au fil du temps, la proportion de spores à faible résistance a augmenté. Le phénomène contraire est observé pour la phase 2 (de $\log N = 3.5$ à $\log N = 2$ en moyenne pour 12 mois contre de $\log N = 5.5$ à $\log N = 2.5$ en moyenne pour 6 mois). Ceci confirme donc qu'une partie des spores de la catégorie « résistance élevée » est passée dans la catégorie « résistance faible ».

Une autre différence est visible si on compare les courbes effectuées au temps 0 (graphique 1 de l'annexe 8), et celle des graphiques 3 et 4. On observe une irrégularité des courbes croissante au fil du temps. Ceci semblerait dire que plus le temps de stockage augmente, plus les spores s'aggrègent fortement. Ce phénomène est d'ailleurs visible à l'œil nu, puisqu'on observe un dépôt de spores au fond de la bouteille lors du stockage.

Pour un stockage de longue durée, le tampon phosphate n'est pas adapté puisqu'il n'assure pas une résistance constante des spores. Le tampon phosphate est par contre très pratique pour des stockages de courte durée, par exemple en vue de test d'inactivation thermique qui utilisent justement le tampon phosphate comme support.

La lyophilisation par contre est une bonne méthode de stockage pour le long terme, comme le prouve les analyses de stabilité effectuées pendant le travail de semestre ainsi que les résultats d'une autre publications. [4], [33]

4.2.4 Droites d'inactivation thermique

B. atrophaeus : Si on compare les droites d'inactivation thermique concernant des spores de *B. atrophaeus* produites selon la même méthode, mais par des personnes différentes à des instants différents ou analysées selon des méthodes différentes à des moments différents, on peut quand-même dégager des constantes. Les graphiques 1, 2, 3, 4 et le graphique 1 de l'annexe 8 montrent qu'à l'intérieur d'une souche pure, il existe 2 populations à résistances très différentes. On voit aussi que l'inactivation en 2 phases se fait modérément à 90 °C, s'accélère très vite dès 100 °C, et se confond à 110 °C, 120 °C, 130 °C et 140 °C. La différence à remarquer est que les spores de la phase 2 appartenant à la production de ce travail de diplôme semblent plus résistantes que celles produites par Federica Milani. En effet, si on compare la résistance des spores fraîchement produites (graphique 1 et 2 et graphique 1 de l'annexe 8) on remarque que le nombre de spores survivantes par ml n'est jamais inférieur à 10^3 pour les graphiques 1 et 2. Tel n'est pas le cas pour le graphique 1 de l'annexe 8 qui possède en plus un nombre initial de spores N_0 plus élevé et des intervalles de temps de chauffage plus courts. Ces différences peuvent provenir soit de l'opérateur, soit de la souche.

B. coagulans : Les graphiques 5 et 6 montrent que l'inactivation se fait aussi en 2 phases, mais que les phénomènes de traînée sont beaucoup moins importants chez *B. coagulans* que chez *B. atrophaeus* (graphiques 1 et 2). On constate aussi que les points des droites de 110 °C, 120 °C, 130 °C et 140 °C sont moins confondus pour *B. coagulans* que pour *B. atrophaeus*.

B. cereus : La différence entre les courbes d'inactivation de *B. cereus* et *B. atrophaeus* et *B. coagulans* observée sur les graphiques 1, 2, 5, 6, 7 et 8 est qu'à 100 °C une seule phase d'inactivation est visible pour *B. cereus* alors que pour *B. atrophaeus* et *B. coagulans* on en discerne 2. De plus, l'intervalle entre les courbes des différentes températures semble régulier pour *B. cereus* alors qu'il l'est moins pour les 2 autres espèces. En effet, chez *B. atrophaeus* les courbes à 120 °C, 130 °C et 140 °C sont pratiquement superposées et chez *B. coagulans* elles sont très proches.

4.2.5 Taux de réduction décimal D

B. atrophaeus : Pour chaque température, les valeurs D de la phase 2 des tableaux 5 et 7 augmentent au fil du temps de stockage dans le tampon phosphate alors que celles de la phase 1 diminuent. Au fil du temps, les souches les plus résistantes (phase 2) le deviennent de plus en plus et les moins résistantes (phase 1) de moins en moins.

L'analyse des spores directement après leur production montre des valeurs D toujours supérieures pour les spores produites lors de ce travail de diplôme (tableau 1, 2 et 3) que pour celles produites lors du travail de diplôme de Federica Milani (tableau 1 de l'annexe 8). Les spores produites lors de ce travail de diplôme sembleraient plus résistantes que celles produites par Federica Milani, comme observé au point 4.2.4.

Les tableaux suivants montrent les comparaisons effectuées entre les valeurs D de *B. atrophaeus* obtenues dans ce travail de diplôme et celles trouvées dans la littérature.

Tableau 17 : Comparaison des valeurs D de 90 °C à 100 °C des spores de *B. atrophaeus* obtenues dans ce travail de diplôme et celles de la littérature

	Température [°C]				
	90		100		
Source	Tab. 1 et 2	[34]	Tab. 1 et 2	[36]	[35]
N ₀ (ufc/ml)	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	-
Souche	DSM 7264	Var.niger	DSM 7264	Var.niger	Var.niger
Milieu/méthode chauffage	Phosphate pH 7/cap	Eau dist. /tube	Phosphate pH 7/cap	Eau dist. /tube	Eau dist. /cannettes
Valeur D [min]	17.7/25.0	40	55.0/13.3	1.0	40

Légende : - : aucune indication disponible

/ : valeur D phase2longue/phase2courte

Tableau 18 : Comparaison des valeurs D à 120 °C des spores de *B. atrophaeus* obtenues dans ce travail de diplôme et celles de la littérature

	Température [°C]	
	120	125
Source	Tab. 1 et 2	[37]
Souche	DSM 7264	Var.niger
Milieu/méthode chauffage	Phosphate pH 7/ cap	Eau dist./cannettes
Valeur D [min]	27.1/13.8	20

Légende : / : valeur D phase2longue/phase2courte

Les tableaux 17 et 18 montrent que la plupart des valeurs D obtenues dans ce travail de diplôme respectent l'ordre de grandeur de celles trouvées dans la littérature. Les valeurs 1.0 min et 40 min pour la valeur D à 100 °C prouvent cependant qu'il existe des différences non négligeables entre les différentes publications. Cela provient sûrement des valeurs considérées pour calculer la valeur D. En effet, certaines publications précisent par exemple que les valeurs obtenues pour des temps de chauffage courts n'ont pas été prises en compte puisque Russell affirme déjà en 1982 qu'elles déviaient de la linéarité. (voir annexe 9) [36] Pour ceci, les valeurs D de la phase 1 ont été négligées pour les comparaisons de ce point 4.2.5.

B. coagulans : De la même manière, les résultats de la recherche de littérature pour *B. coagulans* sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 19 : Comparaison des valeurs D de 100 °C à 120 °C des spores de *B. coagulans* obtenues dans ce travail de diplôme et celles de la littérature

	Température [°C]					
	100		110		120	
Source	Tab. 9	[20]	Tab. 9	[3]	Tab. 10	[3]
Souche	DSM 1	DSM 1	DSM 1	Sp33	DSM 1	-
Milieu chauffage	Phosphate pH 7	-	Phosphate pH 7	-	Phosphate pH 7	Phosphate pH 7
Valeur D [min]	7.0	11 à 12	7.7	2.2 à 2.5	9.4	3.0

Légende : - : aucune indication disponible

Le tableau 19 montre que les comparaisons ne doivent être prises qu'à titre indicatif puisque certaines données manquent comme la souche exacte employée ou la méthode et les milieux de chauffage utilisés pour la détermination de la valeur D. De plus aucune indication quant à l'âge ou à la manière dont les spores utilisées ont été produites n'a pu être trouvée. Or, l'âge de la souche de *B. coagulans* semble avoir un effet sur sa résistance thermique. [37] La manière dont les spores ont été produites interviendrait aussi sur leur résistance à la chaleur. Par exemple, les spores formées à 52 °C sont plus thermorésistantes que celles formées à 35 °C. [38]

Malgré cela, on peut affirmer que l'ordre de grandeur des valeurs D obtenues dans ce travail correspond relativement aux données de la littérature puisqu'elles ne diffèrent que de 5-6 minutes près.

B. cereus : De la même manière, les résultats de la recherche de littérature pour *B. cereus* sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 20 : Comparaison des valeurs D de 90 °C à 120 °C des spores de *B. cereus* obtenues dans ce travail de diplôme et celles de la littérature

	Température [°C]					
	90		100		120	
Source	Tab. 12	[39]	Tab. 12	[41]	Tab. 13	[3]
Souche	Wild type	NCIB 5893	Wild type	NCIB 5893	Wild type	-
Milieu chauffage	Phosph. pH 7	Phosph. pH 7	Phosph. pH 7	Phosph. pH 7	Phosph. pH 7	Phosph. pH 7
Valeur D [min]	60.0	71	21.4	8	6.5	2.37

Légende : - : aucune indication disponible

Le tableau 20 montre que l'ordre de grandeur des valeurs D trouvées dans ce travail de diplôme correspond avec celui de la littérature. La souche wild type étudiée semble cependant être légèrement plus résistante aux températures de 100 °C et 120 °C que la souche NCIB 5893 déjà relativement résistante. Ceci peut-être puisque la souche wild type a été isolée d'une réclamation. Elle a donc du survivre à un traitement qu'une souche « normale » de *B. cereus* ne survivrait pas normalement.

Quelques valeurs plus faibles ont aussi été trouvées dans la littérature. Ces valeurs correspondaient à celles de la phase 1. [40] Elles n'ont pas été prises en considération puisque seules les souches les plus résistantes de *B. cereus* sont d'intérêt dans ce travail de diplôme.

4.2.6 Valeur z

De même que pour les valeurs D, les valeurs z ont été recherchées dans la littérature et comparées avec celles trouvées dans ce travail de diplôme.

B. atrophaeus : Le tableau 4 communique des valeurs z de 17 °C pour la phase 1, et de 95 °C et 108 °C pour la phase 2. Les valeurs z suivantes trouvées dans la littérature peuvent être prises uniquement à titre indicatif puisqu'elles ne correspondent pas toutes à des tests effectués avec de la chaleur humide uniquement.

Les valeurs z de 12.9 °C à 32 °C ont été communiquées pour des tests d'inactivation avec de la chaleur sèche. [41]

La valeur z de 32 °C a été trouvée lors d'expérimentations de l'inactivation par l'oxyde d'éthylène. [42]

Des valeurs z allant de 30 °C à 58.3 °C ont été obtenues lors d'inactivation dans des milieux contenant de 0.1 à 100% d'humidité. [37]

B. coagulans : Le tableau 11 indique des valeurs z de 15 °C pour la phase 1 et de 50 °C pour la phase 2. Une valeur de 7.2 °C obtenue lors de l'inactivation par chaleur humide a été trouvée dans la littérature. [21]

B. cereus : Le tableau 14 donne des valeurs z de 15 °C pour la phase 1 et 37 °C pour la phase 2. Des valeurs z lors d'inactivation à la chaleur humide entre 7.9 °C et 9.7 °C ont été trouvées dans la littérature. [3]

Comparées à la littérature, les valeurs z obtenues dans ce travail de diplôme sont de manière générale légèrement supérieures pour la phase 1 et largement supérieures pour la phase 2. Une explication possible est la suivante : après observation de plusieurs publications il s'est avéré que la plupart travaillaient soit sur un intervalle de temps plus restreint, soit sur un intervalle de température plus restreint que dans ce travail de diplôme.

Si l'intervalle de temps considéré est plus restreint, l'inactivation ne prend pas en compte les traînées et les valeurs D sont donc d'une part plus faibles et surtout, bien plus différentes les unes des autres selon les températures, d'où des valeurs z plus faibles. Il conviendrait donc de ne pas prendre en considération les traînées lors des calculs des valeurs D et z, étant donné que ce phénomène fausse le caractère linéaire, essentiel pour le calcul des

valeurs D et z. [43] Pour ceci les valeurs z à considérer comme significatives sont celles de la phase 1 uniquement.

Si l'intervalle de température étudié est plus petit, le numérateur de la valeur z est plus petit et une erreur sur les valeurs D du dénominateur aura moins d'impact sur z (formule du point 1.2.2). Pour exemple, en recalculant les valeurs z de la phase 1 de *B. atrophaeus*, *B. coagulans* et *B. cereus* en ne considérant qu'un intervalle de 10 °C (entre 90 °C et 100 °C pour *B. atrophaeus* et *B. coagulans* et entre 100 °C et 110 °C pour *B. cereus*) on obtient des valeurs respectives de 14.2 °C, 13.0 °C et 8 °C. Ces valeurs sont plus faibles que celles données par les tableaux 4, 11 et 14 qui prennent en compte des intervalles de temps plus longs (90 °C à 120 °C en général).

4.2.7 Bien fondé des surrogates proposés

Les points précédents permettent de tirer les conclusions suivantes :

B. atrophaeus ne semble pas pouvoir être un surrogate approprié de *B. cereus*. Tout d'abord, les valeurs D de *B. atrophaeus* ne correspondent pas à celles de *B. cereus*. Les tableaux 17, 18 et 20 montrent que les spores de *B. atrophaeus* ont une valeur D trop faible à 90 °C et trop élevée à 120 °C par rapport à *B. cereus*. Cette absence de « parallélisme » (soit toutes les valeurs D sont trop élevées soit toutes les valeurs D sont trop faibles) est liée à la valeur z trop élevée de la 2^{ème} phase d'inactivation de *B. atrophaeus* par rapport à celle de *B. cereus* (point 4.2.6). En effet, les graphiques 2 et 8 montrent que les phénomènes de traînées sont trop importants chez *B. atrophaeus*. A 140 °C par exemple, on décèle toujours des spores de *B. atrophaeus* après 20 min (même en abaissant la courbe d'une unité log pour éradiquer la différence de N_0 entre les 2 graphiques) alors que pour *B. cereus* aucune spore n'est décelable après 9 min. En utilisant *B. atrophaeus* comme surrogate on surestimerait le temps du traitement pour éradiquer les dernières spores de *B. cereus*.

B. coagulans par contre a plus de points communs avec *B. cereus*. Il possède des valeurs z comparables à celles de *B. cereus* (point 4.2.6) et les phénomènes de traînées semblent moins apparents chez *B. coagulans*, comme chez *B. cereus* (graphiques 6 et 8). En observant les tableaux 10 et 13, on remarque qu'entre 120 °C et 140 °C les valeurs D semblent plus ou moins correspondre. Malgré cela, à des températures comprises entre 90 °C et 110 °C *B. coagulans* ne ferait pas un surrogate approprié puisqu'il est beaucoup moins résistant que *B. cereus* wild type (tableaux 9 et 12). Cependant, la souche de *B. cereus* testée dans ce travail de diplôme semble être particulièrement résistante comparée à celles de la littérature. Il faudrait s'assurer que cette souche ne soit pas une exception rarement présente dans les aliments. Il conviendrait aussi de refaire des essais de résistance à la chaleur sur une souche de *B. cereus* standard, fréquemment source d'intoxication alimentaire et possédant une résistance à la chaleur assez élevée.

Au vu de ces constatations, l'hypothèse de *B. atrophaeus* serait à abandonner, celle de *B. coagulans* à approfondir.

4.3 PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES DE CHAUFFAGE

Si une céréale n'a pas été produite correctement et que la concentration de *B. cereus* atteint 10^6 - 10^7 ufc/g, un traitement thermique ne peut plus vraiment « assainir » l'aliment contaminé puisque les toxines (dont la toxine émétisante stable 90 minutes à 126 °C) se produisent généralement à de telles concentrations. Il faut donc éviter que ces concentrations soient atteintes et pour ceci, recommander la production selon les bonnes pratiques de fabrication.

Un procédé thermique a cependant son utilité puisqu'il permet de réduire la concentration de *B. cereus* de manière à ce qu'elle ne dépasse pas 10^5 - 10^6 ufc/g et ainsi éviter la production de toxines. Si on part du principe qu'une céréale brute peut encore contenir de 10^2 - 10^5 ufc/g de *B. cereus* il faudrait appliquer un traitement thermique qui offre une réduction de 6D afin d'obtenir une concentration de 10^{-1} ufc/g de *B. cereus*. En effet, si on suppose que ces céréales sont conservées dans un réfrigérateur défectueux à 12 °C et atteignent une valeur $a_w \sim 1$ (stockage dans un peu lait), il faut encore 4 jours pour que les bactéries se multiplient et atteignent la concentration critique de 10^7 ufc/ml. [44], [45], [46], [47], [48]

Ce cas très défavorable a été considéré puisque les céréales elles-mêmes ne sont pas un produit à risque car elles ne sont pas assez humides pour permettre une croissance bactérienne. Les produits à risque seraient par exemple des céréales de petit-déjeuner oubliées dans du lait ou des bouillies de céréales pour nourrissons qui ont été reconstituées par ajout d'eau. [49]

Le tableau 16 montre que la cuisson-extrusion aux conditions testées dans ce travail de diplôme semble être un processus adapté pour assurer une concentration en spores de *B. cereus* insuffisante pour présenter un risque. En effet, aucune des spores très résistantes de *B. atrophaeus* appartenant au phénomène de traînée n'a été décelée. Or ces spores semblent être bien plus résistantes que celles de *B. cereus* (graphique 2 et 8). De plus, la réduction d'au moins 5D obtenue pour *B. atrophaeus* est certainement sous-évaluée et l'inactivation est sûrement bien supérieure, comme le laisse présager les résultats du tableau de la page 1392 de l'article « Methodology to determine destruction of bacterial spores during extrusion cooking ». [50]

La taille des particules et la proportion de matière sèche du mélange à extruder ont aussi une influence sur la vitesse de transfert de chaleur dans la masse au cours du processus d'extrusion. [51] Des essais dans du lait écrémé et du lait écrémé concentré sur *B. coagulans* appuient l'hypothèse qu'une matière sèche élevée protège les spores. [38] Selon le tableau 15, la matière sèche peut être considérée comme élevée puisqu'elle est d'environ 86% alors que les autres publications consultées travaillent entre 14% et 20% d'humidité. [52], [52] Malgré cela, les spores de *B. atrophaeus* sont quand-même réduites d'un facteur d'au moins 5D.

L'inactivation importante lors de la cuisson-extrusion peut-être expliquée de différentes manières :

La diminution du nombre de bactéries végétatives et de spores de *B. subtilis* et *B. stearothermophilus* serait due à une combinaison des forces de cisaillement et de la chaleur. De plus, des études sur *B. globigii* (ancien nom de *B. atrophaeus*) affirment que les températures modérées du début du processus d'extrusion favoriseraient la destruction des spores. [53], [53], [54]

On peut donc supposer que ces phénomènes se sont appliqués pour *B. atrophaeus* et s'appliqueront de la même manière pour *B. cereus*.

Ces observations permettent de conclure que les paramètres temps/température appliqués lors de l'extrusion de l'expérience pilote assurent une réduction suffisante de *B. cereus* pour éviter un risque d'intoxication alimentaire, même pour un mélange à extruder riche en matière sèche. Cependant, pour assurer que les processus de cuisson-extrusion en général permettent d'éradiquer les risques liés à *B. cereus*, il conviendrait de tester des paramètres temps/températures inférieurs lorsqu'un surrogate approprié sera trouvé. Ceci permettrait de déterminer le temps et les températures limites qui assurent une réduction suffisante de *B. cereus*. En effet, les températures appliquées diffèrent relativement et sont situées entre 80 °C et 180 °C, selon les publications.

4.4 CHOIX D'UN SURROGATE

Aucun protocole standardisé pour la sélection et la validation d'un surrogate de pathogène n'a été trouvé dans la littérature. Il semblerait que l'identification de surrogates et le développement de protocoles standardisés et validés pour l'utilisation de surrogates lors de tests d'efficacité de procédures de maîtrise des pathogènes soit une des préoccupations actuelles du monde scientifique. [9] D'ailleurs, quelques propositions ont déjà été publiées. Il conviendrait par exemple de commencer par émettre des suppositions quant au choix du surrogate, puis d'en faire un modèle qu'il faudra ensuite valider. [55]

Il n'est parfois pas possible ou pas nécessaire de trouver un surrogate qui simule le comportement d'un organisme pour n'importe quel traitement car un bon surrogate pour un traitement ne l'est pas forcément pour un autre. Comme surrogate de spores de *B. anthracis* par exemple, on trouve les spores de *B. subtilis* s'il s'agit de désinfection à l'UV 254 nm ou les spores de *B. cereus* ATCC 9818 et *B. subtilis* ATCC 6633 pour la résistance thermique. [56], [57]

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs principaux de ce travail de diplôme ont été atteints puisque les spores des différentes souches de *Bacillus* ont pu être produites, testées et comparées au niveau de leur résistance à la chaleur, qu'un surrogate potentiel a pu être introduit dans le processus de cuisson-extrusion et qu'un protocole de procédures appropriées au développement et à la validation de surrogates a pu être proposé.

Dans la continuation de ces objectifs, plusieurs perspectives à ce travail de diplôme seraient possibles que ce soit au niveau de la méthode, de la cuisson-extrusion ou des surrogates.

On pourrait tout d'abord s'intéresser à l'optimisation de la détermination de la résistance à la chaleur par méthode capillaire pour des intervalles de temps courts. Cette étude serait pertinente puisque beaucoup de process industriels sont de quelques secondes à hautes températures. Ceci pourrait être réalisé par l'élaboration d'un dispositif comportant une sonde de température à l'intérieur des capillaires, comme déjà réalisé dans d'autres laboratoires.

L'importance de l'extrusion et de la notion de sécurité dans l'industrie alimentaire sont croissantes. Il serait ainsi propice d'intensifier les tests de survie de surrogates suite à la cuisson-extrusion. Ceci pourrait être réalisé en faisant varier les paramètres matrice/temps/températures et nombre de fourreaux de l'essai. Etant donné les possibilités infinies de combinaisons de ces paramètres, le plus adapté serait d'établir un partenariat avec des entreprises employant la cuisson-extrusion et de tester exactement les paramètres matrice/temps/températures et nombre de fourreaux qu'elle utilise.

En ce qui concerne les surrogates, on pourrait poursuivre l'étude de *B. coagulans* DSM 1 en tant que surrogate de *B. cereus* pour des processus d'inactivation à la chaleur, même si le surrogate ne sera peut-être valable que pour une plage de température restreinte. Ceci par la répétition des mesures d'inactivation thermique sur *B. coagulans* DSM 1 ainsi que sur une souche résistante de *B. cereus* fréquemment responsable d'intoxication alimentaire.

Il serait aussi intéressant d'étudier l'étape inverse de l'inactivation thermique en cherchant un surrogate qui simule la croissance de *B. cereus*. Cette croissance serait à maîtriser car une fois que la toxine thermostable de *B. cereus* est présente dans l'aliment, il devient très difficile de l'inactiver puisqu'elle est stable 90 minutes à 126 °C. [48] Cette optique « prévenir vaut mieux que guérir » est d'actualité puisque la « Food Safety and Inspection Service » de Washington étudie un surrogate pour la croissance de *L. monocytogenes* dans des aliments « Ready-to-Eat ». [58]

6 REMERCIEMENTS

Dr Esther Schmitt pour sa disponibilité, son soutien, sa gentillesse et ses conseils posés.

Dr Rudolf Schmitt pour le partage de son expérience et ses conseils très pertinents.

Dr Katia Szynalski et Heinz Flückiger pour leur grande disponibilité et précieuse collaboration.

Bruno Lehner et le personnel du laboratoire de microbiologie pour leur aide, leur compréhension et la très bonne atmosphère de travail.

7 BIBLIOGRAPHIE

[1]: Milani F., Production de spores de *B. atrophaeus* et détermination de leur résistance à la chaleur, travail de diplôme, HEVs, Sion, (2005)

[2]: Milchwissenschaftliche Forschung Weihenstephan, rapport annuel, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Technische Universität München, (2005), 88

[3]: Russell A.D., The Destruction of Bacterial Spores, Academic Press, (1982), 41-62

[4]: Devantéry N., Détermination de la résistance à la chaleur de spores de *Bacillus atrophaeus* par méthode capillaire, travail de semestre, HEVs, Sion, (2006), 9-25

[5]: Heldman D.R. and Newsome R.L., Kinetic Models for Microbial Survival During Processing, Food Technology, 57, 40-46, (2003)

[6]: Valdramidis V.P., Bernaerts K., Van Impe J.F. and Geeraerd A.H., An alternative Approach to Non-Log-Linear Thermal Microbial Inactivation: Modelling the Number of Log Cycles Reduction with Respect to Temperature, Food Technology and Biotechnology, 43, 321-327, (2005)

[7]: Couvert O., Gaillard S., Savy S., Mafart P. and Leguérinel I., Survival curves of heated bacterial spores : effect of environmental factors on Weibull parameters, International Journal of Food Microbiology, 101, 73-81, (2004)

[8]: Schmitt R., Cinétique d'inactivation, support de cours, HEVs, Sion, (1999), 2-5

[9]: Busta F.F., Indicators/Surrogates vs. Pathogens, présentation power point, University of Minnesota, (2002), 24

[10]: U. S. Food and Drug Administration, Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce, rapport de l'Institut, (2001), chapitre VII

[11]: STS division of Ethox Corp, Biological indicators, (11.04.06),

<http://www.stsduotek.com/bio-indicators.html>

[12] : Food Protection, Symposium Abstracts, (07.09.06),

<http://www.foodprotection.org/meetingsEducation/IAFP%202006/IAFP%2006%20Symposium%20Abstracts.pdf#search=%22symposium%20abstracts%20claudia%20coles%22>

[13] : Schmitt R., Lebensmittelmikrobiologie, support de cours, HEVs, Sion, 46-48

[14] : Vaisainen O.M, Mwaishumo N.J and Salkinoja-Salonen M.S, Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis, Journal of Applied Bacteriology, 70, 315-324, (1991)

[15] : Van Netten P., van de Moosdijk A., van Hoensel D. et al., Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxins, Journal of Applied Bacteriology, 69, 73-79, (1990)

[16] : Nakaruma L.K., Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov., International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 295-300, (1989)

[17] : Burke S.A., Wright J.D, Robinson M.K., Bronk B.V. and Warren R.L., Detection of Molecular Diversity in *Bacillus atrophaeus* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, Applied and Environmental Microbiology, 70, 2786-2790, (2004)

[18] : Dagmar F. and Rüdiger P., Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 35-37, (2001)

[19] : De Vecchi E. and Drago L., *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or Mislabelling?, International Journal of Probiotics and Prebiotics, 1, 3-10, (2006)

[20] : Gottschalk G. and Schlegel H.G., *Bacillus coagulans* HAMMER 1915 und andere thermophile oder mesophile, säuretolerante *Bacillus*-Arten eine taxonomische Untersuchung, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen, (1984), 54-55

[21] : Russell A.D., Hugo W.B. and Ayliffe G.A., Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation, Blackwell Scientific Publications, (1982), 457

[22] : Lehner B., Konservierung von Mikroorganismen, méthode interne DI8111, HEVs, Sion, (2005)

[23] : Luginbühl L., Cuiseuse-Extrudeuse bi-vis, Consignes de poste halle pilote agroalimentaire, HEVs, Sion, (2006)

[24] : Thomàs J., López Pedemonte T.J., Roig-Sagués A.X., Trujillo A.J., Capellas M. and Guamis B., Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in

Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme, Journal of Dairy Science, 86, 3075-3081, (2003)

[25] : Palop A., Sala F.J and Condón S., Occurrence of a Highly Heat-Sensitive Spore Subpopulation of *Bacillus coagulans* STCC 4522 and Its Conversion to a More Heat-Stable Form, Applied and Environmental Microbiology, 63, 2246-2251, (1997)

[26] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 56 « Microbiologie », points B, C et D, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[27] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 14 « Céréales, produits de l'industrie meunière », point 1.8.1, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[28] : Brochure d'application Mettler, mettler Instrument AG, 1987, 32

[29] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 66 « Unités de mesure ». Office fédérale de la santé publique, point « Dichte », Berne, (2000)

[30] : Bounoun K., Développement de céréales de petit-déjeuner pour les enfants, travail de diplôme, HEVs, (2005), 28

[31] : Ryu J.H., Kim H. and Beuchat L.R., Spore Formation by *Bacillus cereus* in Broth as Affected by Temperature, Nutrient Availability and Manganese, Journal of Food Protection, 68, 1734-1738, (2005)

[32] : Helfinstine S.L., Vargas-Aburto C., Uribe R.M. and Woolverton C., Inactivation of *Bacillus* Endospores in Envelopes by Electron Beam Irradiation, Applied and Environmental Microbiology, 71, 7029-7032, (2005)

[33] : Young E., Characteristics of an abortively disporic variant of *Bacillus cereus*, Journal of Bacteriology, 88, 242-254, (1964)

[34] : Barbeau B., Huffman D., Mysore C., Desjardins R., Clément B. and Prévost M., Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide, Journal of environmental Engineering and Science, 4, 139-151, (2005)

[35] : Odlaug T.E., Caputo R.A. and Graham G.S., Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores, Applied and Environmental Microbiology, 41, 1374-1377, (1981)

[36] : Bender G.R. and Marquis R.E., Spore Heat Resistance and Specific Mineralization, Applied and Environmental Microbiology, 50, 1414-1421, (1985)

[37] : Peeler J.T., Reyes A.L., Crawford R.G. Wheby A.J. and Campbell J.E., Thermal Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* in a Closed System, Applied and Environmental Microbiology, 33, 52-58, (1977)

- [38] : Behringer R. and Kessler H.G., Thermal Destruction Kinetics of Spores of Selected *Bacillus* Strains in Skimmilk and Skimmilk Concentrate, International Dairy Journal, 2, 233-242, (1992)
- [39] : Fernandez Coll F. and Silva N.L., Spore age and its effect on thermal resistance of *Bacillus coagulans* and *Bacillus macerans* in acid ripe plantain puree, Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico (PRI), 75, 205-211, (1991)
- [40] : Palop A., Marco A., Raso J., Sala F.J. and Condón S., Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid, International Journal of Food Microbiology, 38, 25-30, (1997)
- [41]: ICMSF, Microorganisms in foods 5, Characteristics of microbial pathogens, Blackie academic & professional, (1996), 27-28
- [42] : Richardson K. and George B., A bulletin for the Australian Food Industry, Food Safety and Hygiene, Food Science Australia, (1999)
- [43] : Influence of Spore Moisture Content on the Dry-Heat Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*, Applied Microbiology, 16, 735-745, (1968)
- [44] : Mosley G.A., Gillis J.R. and Krushefski G., Evaluating the formulae for integrated lethality in ethylene oxide sterilization using six different endospore forming strains of bacteria, and comparisons of integrated lethality for ethylene oxide and steam systems, Journal of pharmaceutical science and technology, 59, 64-86, (2005)
- [45] : Anderson W.A., McClure P.J., Baird-Parker A.C. and Cole M.B., The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213 B at temperature below 121.1 °C, Journal of Applied Bacteriology, 80, 283-290, (1996)
- [46] : Notermans S. and Batt C.A., A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 84, 51S-61S, (1998)
- [47] : Kimanya M.E., Mamiro P.R.S., Van Camp J., Devlieghere F., Opsomer A., Kolsteren P. and Debevere J., Growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* during germination and drying of finger millet and kidney beans, International Journal of Food Science and Technology, 38, 119, (2003)
- [48] : Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), Fiches microorganismes de l'Afssa : *Bacillus cereus*, (20.09.06)
<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/fiches/mic/Bacillus%20cereus/Fiche%20Bacillus%20cereus.pdf#search=%22Bacillus%20cereus%20126%20%C2%B0C%2090%20min%22>,
- [49] : Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., te Giffel M. and Peeters Weem P., A Risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk, Food Microbiology, 14, 143-151, (1997)
- [50] : Dervin K., Société française de statistique (SFDS), Le citoyen, les risques alimentaires et la statistique, (20.09.06)

<http://www.sfds.asso.fr/groupees/22mars2006/22mars2006CD.pdf#search=%22seuil%20acceptabilit%C3%A9%20europe%20b%20cereus%22>

[51] : Jaquette C.B. and Beuchat L.R., Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal, *Journal of Food Protection*, 61, 1629-1635, (1998)

[52] : Likimani T.A., Sofos J.N., Maga J.A. and Harper J.M., Methodology to determine destruction of bacterial spores during extrusion cooking, *Journal of Food Science*, 55, 1388–1393, (1990)

[53] : Okelo P.O, Wagner D.D., Carr L.E., Wheaton F.W., Douglass L.W. and Joseph S.W., Optimization of extrusion conditions for elimination of mesophilic bacteria during thermal processing of animal feed mash, *Animal Feed Science and Technology Journal*, 129, 116-137, (2006)

[54] : Korus J., Gumul D. and Achremowicz B., The influence of extrusion on chemical composition of dry seeds of bean, *Food Science and Technology, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9, 1, (2006)

[55] : Bulut S., Waites W.M. and Mitchell J.R., Effects of combined shear and thermal forces on destruction of *Microbacterium lacticum*, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 4464-4469, (1999)

[56] : Likimani T.A. and Sofos J.N., Bacterial spore injury during extrusion cooking of corn/soybean mixtures, *International Journal of Food Microbiology*, 11, 243-250, (1990)

[57] : Monville T., Thermal Resistance of *Bacillus anthracis* Spores and Surrogates, *Proceedings of the Institute of Food Technologists' First Annual Food Protection & Defense Research Conference*, The State University of New Jersey, (2005)

[58] : Nicholson W.L. and Galeano B., UV Resistance of *Bacillus anthracis* Spores Revisited: Validation of *Bacillus subtilis* Spores as UV Surrogates for Spores of *B. anthracis* Sterne, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1327-1330, (2003)

[59] : De Siano T., Padhi S., Schaffner D.W. and Montville T.J., Growth Characteristics of Virulent *Bacillus anthracis* and Potential Surrogate Strains, *Journal of Food Protection*, 69, 1720-1723, (2006)

[60] : National Advisory Committee on Microbiological Criteria For Foods (NACMCF), Potential Scientific Parameters that Must be Considered to Establish Global Dates for Refrigerated Ready-to-Eat Foods, *Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture Washington, D.C.* 20250-3700, (2002)

8 ANNEXES

1. Mode opératoire pour la production de spores
2. Mode opératoire pour la détermination de la résistance à la chaleur
3. Mode opératoire de l'expérimentation d'un procédé technologique de chauffage
4. Préparation de la cuiseuse-extrudeuse
5. Paramètres machine de la cuiseuse-extrudeuse
6. Courbes de calibration des débits de poudre et d'eau de la cuiseuse-extrudeuse
7. Courbes de régression pour l'obtention de la valeur z
8. Courbes d'inactivation des spores de *Bacillus atrophaeus* directement après leur production
9. Destruction des spores de *Bacillus coagulans* dans du lait écrémé et concentré

Mayoraz-Devantéry Nathalie

MODE OPÉRATOIRE POUR LA DÉTERMINATION DE LA RÉSISTANCE À LA CHALEUR

Pour la détermination de la résistance à la chaleur, la méthode des capillaires immergés dans un bain de glycérine a été utilisée. Avant de mener à bien les essais, il faut d'abord vérifier le bon fonctionnement du thermostat ainsi que la pureté et la concentration de la suspension de spores à disposition. Les étapes clés de la méthode de détermination de la résistance à la chaleur sont résumées par le schéma de la figure ci-dessous, puis expliquées de manière détaillée.

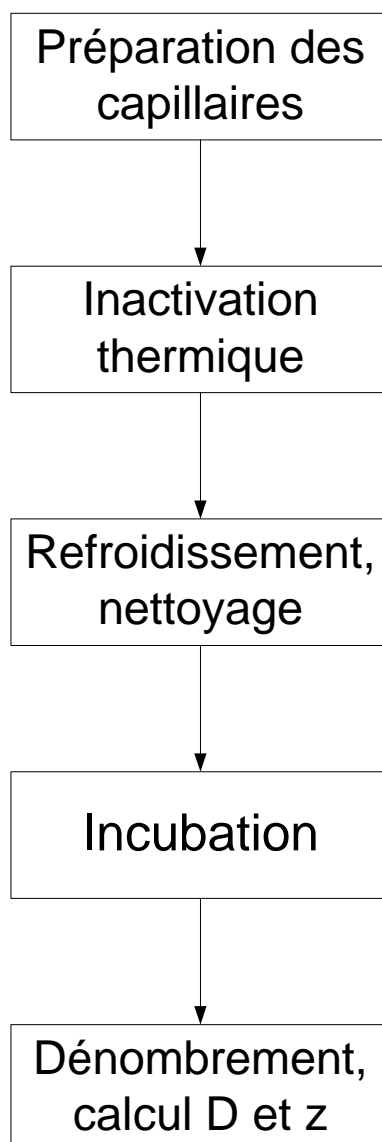


Illustration 1 : Schéma de flux de la détermination de la résistance à la chaleur

Préparation du capillaire

Introduire par aspiration 0.05 ml de la solution de spores à analyser dans un capillaire de 0.05 ml. Pour les essais, le nombre de spores initial oscillait entre 10^8 ufc/ml et 10^9 ufc/ml selon les souches utilisées. Cependant, le nombre initial ne doit théoriquement pas avoir d'influence sur la résistance à la chaleur des spores.

Souder la partie inférieure, puis la partie supérieure du capillaire à l'aide d'un chalumeau. Ces étapes de soudage sont critiques. Afin d'éviter des soudures non étanches qui engendrent une perte de liquide et une contamination du bain thermostatisé, il convient de laisser un peu d'air aux deux extrémités du capillaire et de ne pas rester trop longtemps sous la flamme du chalumeau.

Inactivation thermique

Introduire les capillaires à l'aide d'une pince sur le statif immergé dans le thermostat. Les températures et les intervalles de temps pendant lesquels les capillaires sont entièrement plongés dans la glycérine sont les suivants :

- 90 °C : 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70 et 90 min
- 100 °C : 2, 4, 8, 12, 16, 20, 25 et 30 min
- 110 °C : 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12 et 16, 20, 25 et 30 min
- 120 °C : 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 16 et 20 min
- 130 °C : 15 sec, 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 16 et 20 min
- 140 °C : 15 sec, 30 sec, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 16 et 20 min

Refroidissement et nettoyage des capillaires

Après le temps requis, ôter les capillaires du bain de glycérine à l'aide d'une pince et les plonger dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes. En abaissant plus vite la température du capillaire, on stoppe le processus d'inactivation thermique plus rapidement.

Tremper les capillaires successivement dans 2 bains d'acétone à 100%, puis dans un bain composé de 10% d'acide chlorhydrique 0.1 N et de 90 % d'éthanol absolu. Le passage dans ces bains, entrecoupé à chaque fois de bain d'eau glacée, permet d'enlever toute impureté de la surface du capillaire. En effet, les impuretés pourraient contaminer le liquide du capillaire, lors de l'ouverture de ce dernier.

Incubation

Ouvrir les extrémités du capillaire à l'aide d'un stylo à pointe de diamant et récupérer le liquide dans un tube épendorf stérile de 1.5 ml.

Prélever 0.05 ml afin d'effectuer plusieurs séries de dilutions, suivant le nombre de spores survivantes attendues. Les dilutions se font dans des tubes épendorf contenant 450 µl d'eau physiologique (eau déminéralisée supplémentée de 0.85% de NaCl et 0.1% de peptone).

Ensemencer en surface des plaques de Nutrient Agar (NA) avec les dilutions appropriées et incubé pendant 18-24h à 37 °C pour *B. atrophaeus* et *B. coagulans* et 30 °C pour *B. cereus*. Toutes les incubations se font en double.

Dénombrement

Toutes les colonies sont comptées et les calculs effectués, pour obtenir un résultat en ufc/ml selon les recommandations des points B, C et D du Manuel suisse des denrées alimentaires [1] avec la précision suivante :

- Les résultats sont communiqués avec un chiffre après la virgule.

Calcul du taux de réduction décimal D et de la valeur z

Si on considère que la destruction des bactéries suit une cinétique du premier ordre, on peut alors caractériser la sensibilité d'une souche à la chaleur par les valeurs D et z.

La valeur D est le temps (en minutes) nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 (ou de 90%) le nombre initial de germes N_0 , pour un micro-organisme donné dans des conditions précises. Elle se calcule soit graphiquement, soit par la formule suivante :

$$D_{T^{\circ}C} = \frac{t}{\log N_0 - \log N} \quad [\text{min}] \quad [2]$$

Légende :

t : durée du traitement [min]

N_0 : nombre de germes initial [-]

N : nombre de germes après t minutes de traitement [-]

La valeur z est l'écart de température requis pour obtenir un taux de réduction d'un facteur 10. La valeur z se calcule graphiquement ou par l'équation suivante :

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \quad [^{\circ}C] \quad [2]$$

Légende :

T_1 : 1^{ère} température à laquelle a lieu le traitement [$^{\circ}C$]

T_2 : 2^{ème} température à laquelle a lieu le traitement [$^{\circ}C$]

D_1 : valeur D pour la 1^{ère} température [min]

D_2 : valeur D pour la 2^{ème} température [min]

[1] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 56 « Microbiologie », Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[2] : Schmitt R., Cinétique d'inactivation, support de cours, HEVs, Sion, (1999), 2-5

MODE OPÉRATOIRE DE L'EXPÉRIMENTATION D'UN PROCÉDÉ TECHNOLOGIQUE DE CHAUFFAGE

Dans ce travail de diplôme, le procédé technologique de chauffage qui a été expérimenté est la cuisson-extrusion. La figure suivante montre les étapes nécessaires à la réalisation de l'expérience. Elles seront ensuite détaillées.

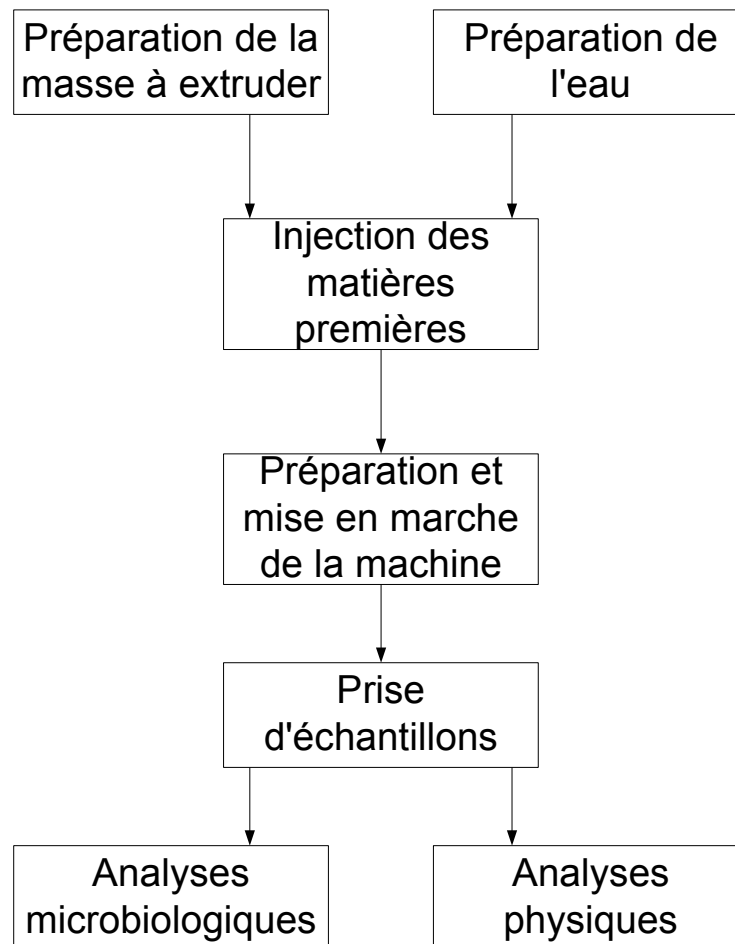


Illustration 1 : Schéma de l'expérimentation de la survie des spores lors de leur passage dans la cuiseuse-extrudeuse.

Préparation de la masse à extruder

Peser 4.45 kg de semoule de maïs, 100 g de sel, 50 g d'huile et 400 g de sucre.

Introduire les ingrédients dans le mélangeur à poudre et laisser homogénéiser le mélange pendant 15 minutes, à la vitesse 1.

Préparation de l'eau

Préparer 340 ml de suspension de spores de *B. atrophaeus* (concentration : $8.3 \cdot 10^7$ spores/ml eau). La production se fait selon l'annexe 1.

Injection des matières premières

Introduire le mélange de poudre dans le doseur situé sur le haut de l'extrudeuse.

Remplir d'eau le réservoir prévu à cet effet et situé sur le bord de l'extrudeuse. Lorsque la machine aura atteint l'état stationnaire, l'ajout de la solution de spores se fera par cette entrée, ceci afin de restreindre la contamination de la machine. Les 340 ml de suspension de spores seront ajoutés lorsque le niveau d'eau du réservoir ne sera plus que de 2.2 cm, ceci afin de garantir une concentration de $5.3 \cdot 10^6$ spores dans le produit juste avant extrusion.

Préparation et mise en marche de la machine

Monter les vis de la cuiseuse-extrudeuse Clextral selon le schéma de l'annexe 4.

Fixer les paramètres machine selon l'annexe 5.

Calibrer la pompe à eau et à poudre ou se fier directement au graphique de l'annexe 6.

Mettre en marche la cuiseuse-extrudeuse selon les consignes de poste de la halle pilote agroalimentaire de la HEVs. [1]

Prise d'échantillon

Prendre 2 échantillons de poudres avant extrusion.

La prise d'échantillon des produits expansés commence lorsque la machine a atteint sa stabilité (température des fourreaux, vitesse de rotation des vis, pression à l'entrée et à la sortie, ampérage et débit ne variant pas plus de 5%, c'est-à-dire après 1h environ). Pendant 1 heure, prélever 1 échantillon de 40 g chaque 10 min.

Analyses microbiologiques

Les 2 échantillons prélevés avant le traitement thermique ainsi que les 6 prélevés après le traitement thermique sont analysés microbiologiquement.

Préparer les échantillons et effectuer le dénombrement selon le Manuel suisse des denrées alimentaires [2] avec les précisions et modifications suivantes :

- Les échantillons de masse sèche à extruder, prélevés avant le traitement thermique sont chauffés pendant 30 min à 80 °C afin de détruire toutes les bactéries végétatives présentes. En effet, seul le nombre initial de spores est pertinent.
- Chaque dilution estensemencée sur 2 plaques de Petri.
- Les résultats sont communiqués avec un chiffre après la virgule.

Analyses physiques

Effectuer toutes les analyses physiques suivantes sur tous les échantillons prélevés, excepté la granulométrie qui ne se fait que sur les échantillons de poudre prélevés avant extrusion.

Granulométrie : Effectuer l'analyse de la taille des particules du mélange à extruder (semoule de maïs, sel et sucre) selon les directives du Manuel suisse des denrées alimentaire [3], avec la modification suivante :

- Utiliser des tamis de diamètre nominal de 1.12 mm, 0.63 mm et 0.25 mm.

Matière sèche : Effectuer le dosage de la matière sèche du mélange à extruder ainsi que des céréales expansées à l'aide d'une balance infrarouge et régler les paramètres de la balance suivant les recommandations pour l'analyse de la semoule de soja (aliment le plus proche) de la brochure Mettler. [4]

Densité des céréales non extrudées : Effectuer le calcul de la densité des céréales non extrudée selon le Manuel suisse des denrées alimentaires. [5]

Densité des céréales extrudées :

La mesure de la densité des céréales extrudées a été effectuée selon une méthode interne développée par Khalid Bounoun durant son travail de diplôme en 2005. [6]

Avant de commencer les mesures, placer le cylindre sur la balance et tarer. En effet, les mesures M, M2 et M3 ne comprennent pas la masse du cylindre.

Placer les céréales extrudées dans un cylindre de manière à le remplir jusqu'à la graduation de 200 ml.

Peser le cylindre avec les céréales (→ M).

Remplir le cylindre (rempli avec des céréales) avec du sucre, de manière à combler les vides.

Peser le cylindre contenant les céréales et le sucre (→ M3).

Vider le cylindre et le remplir à nouveau, mais uniquement avec du sucre, jusqu'au même niveau que précédemment (200 ml).

Peser le cylindre contenant le sucre (→ M2).

Appliquer la formule ci-après :

$$\rho = \frac{M \cdot M2}{V \cdot (M2 + M - M3)}$$

Légende:

ρ : densité [g/cm³]

V: volume dans le récipient [ml]

M : masse de céréales dans le mélange [g]

M2 : masse du sucre [g]

M3 : masse de céréales + sucre [g]

[1] : Luginbühl L., Cuiseuse-Extrudeuse bi-vis, Consignes de poste halle pilote agroalimentaire, HEVs, Sion, (2006)

[2] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 56 « Microbiologie », points B, C et D, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[3] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 14 « Céréales, produits de l'industrie meunière », point 1.8.1, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[4] : Brochure d'application Mettler, mettler Instrument AG, (1987), 32

[5] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 66 « Unités de mesure », Office fédérale de la santé publique, point « Dichte », Berne, (2000)

[6] : Bounoun K., Développement de céréales de petit-déjeuner pour les enfants, travail de diplôme, HEVs, (2005), 28

PRÉPARATION DE LA CUISEUSE-EXTRUDEUSE

Tableau 1: Ordre et caractéristiques des vis montées sur l'axe [1]

N° de vis	Nom du tronçon	Pas [mm]	Longueur [cm]
1	C2F	16.6	10
2	C2F	16.6	10
3	C2F	12.5	5
4	C2F	0.8	5
5	BLO2	5	5
6	C2F	6.6	10
7	C2F	16.6	10
8	C2F	12.5	5
9	C2F	0.8	5
10	C2FC	8	2.5
11	C2FC	8	2.5

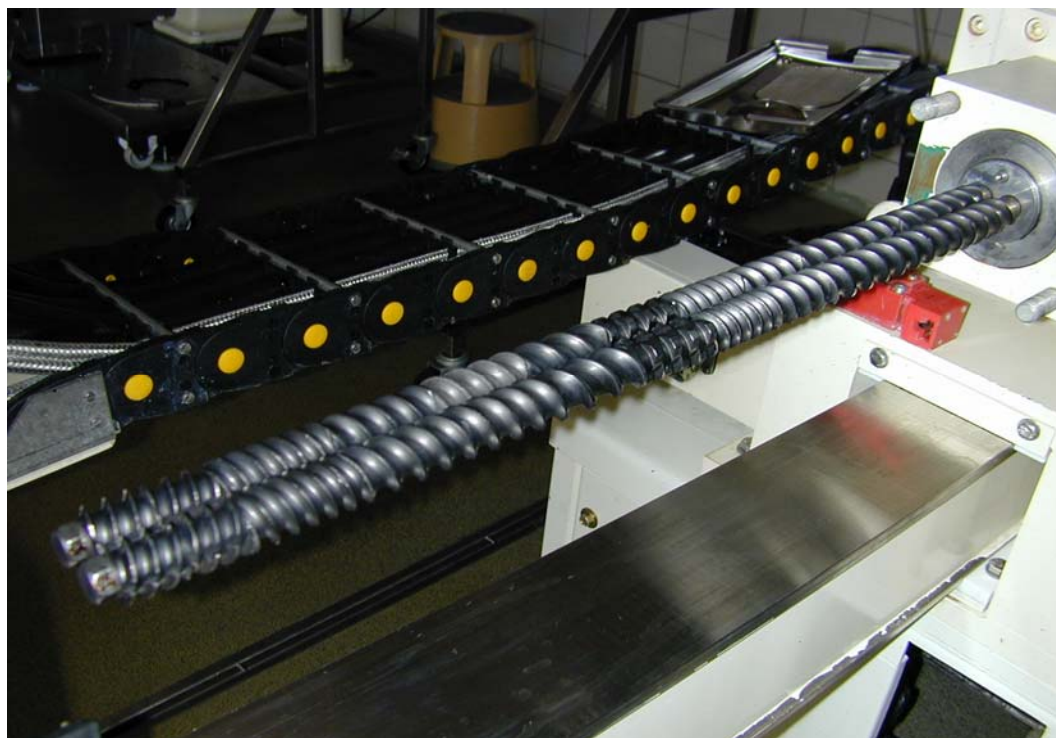


Illustration 1: Montage des vis correspondant, de droite à gauche, à l'ordre du tableau ci-dessus

[1] : Graujon F. et Bruyas L., Recueil standards Clextal, éléments de vis gamme BC, 7-12, (1997)

PARAMÈTRES MACHINE DE LA CUISEUSE-EXTRUDEUSE

Tableau 1: Paramètres à régler sur l'extrudeuse et signification

Variables	Consigne	Signification
Température cibles des fourreaux	0/50/70/120/150/160 °C	
Vitesse de rotation des vis	332 tr/min	
Pression d'entrée	9 bar	
Pression de sortie	20 bar	
Ampérage	4.8 A	
Débit des vis	33 [-]	8.7 kg/h
Débit d'eau	20 %	0.6 l/h

COURBES DE CALIBRATION DES DÉBITS DE POUDRE ET D'EAU DE LA CUISEUSE-EXTRUDEUSE

Tableau 1: Courbe de calibration pour le débit de poudre

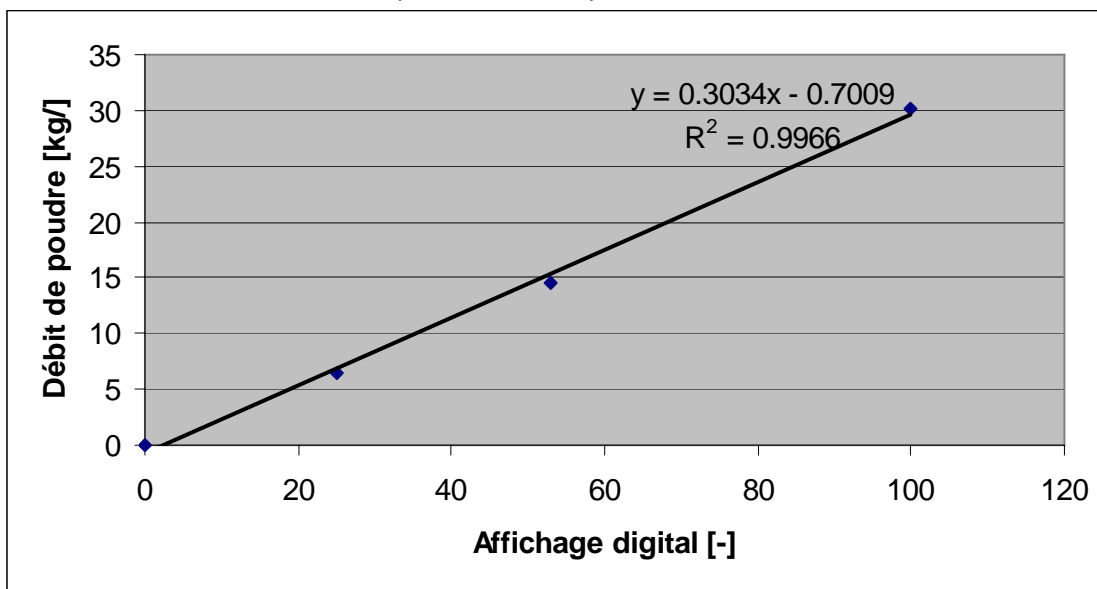
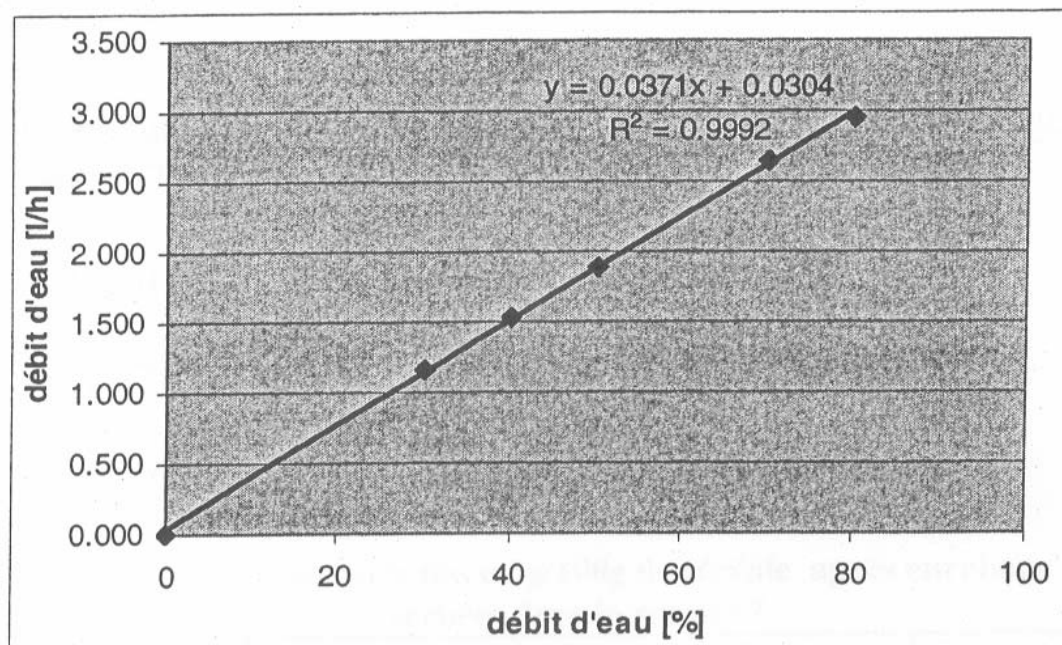
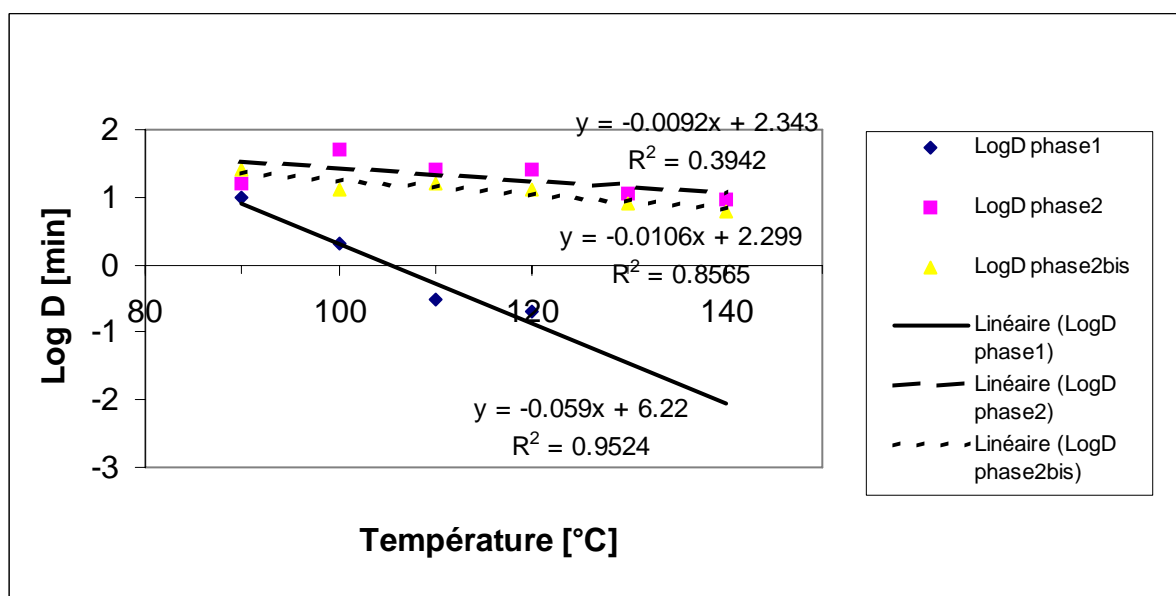


Tableau 2: Courbe de calibration pour le débit d'eau [1]

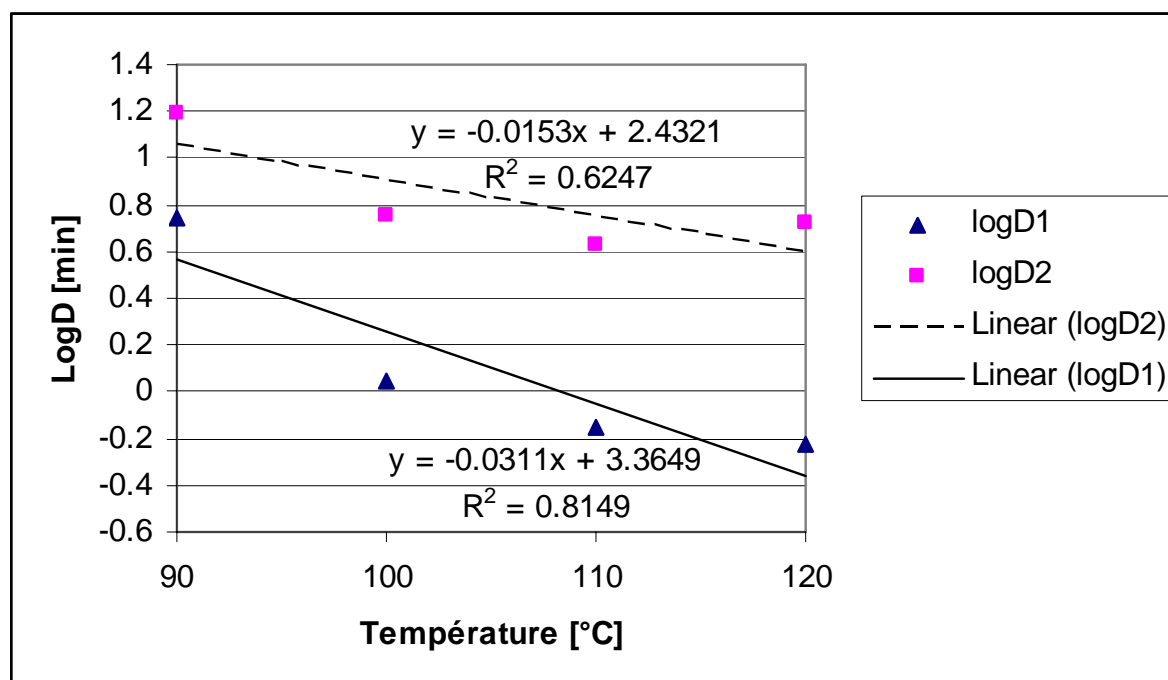


[1] : Bounoun K., Développement de céréales de petit-déjeuner pour les enfants, travail de diplôme, HEVs, Sion, (2005), 37

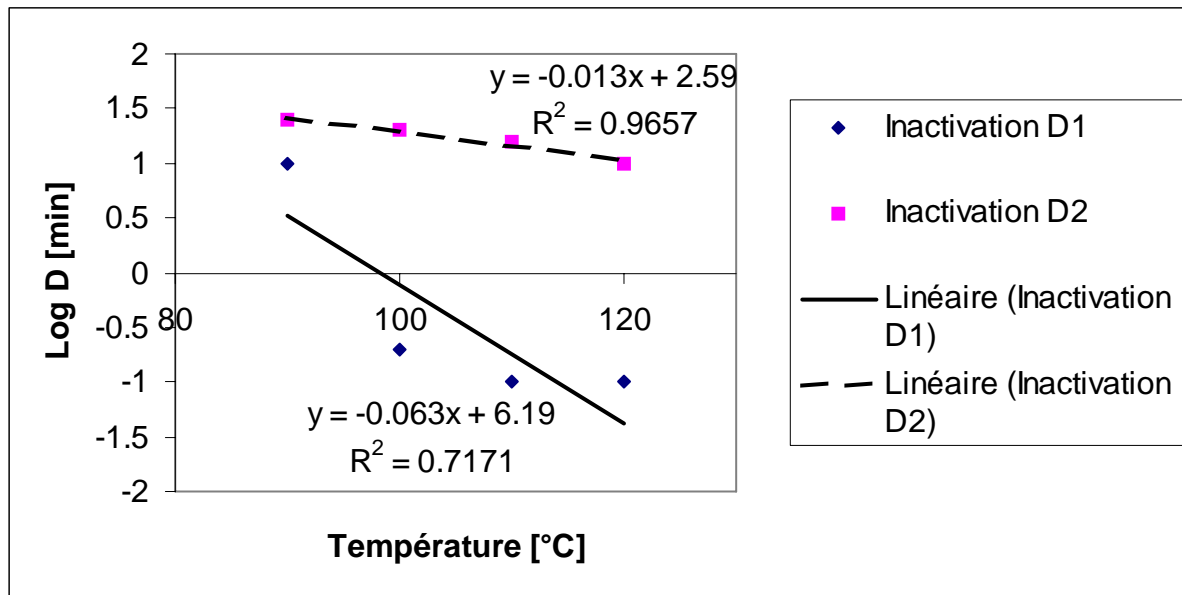
COURBES DE RÉGRESSION POUR L'OBTENTION DE LA VALEUR Z



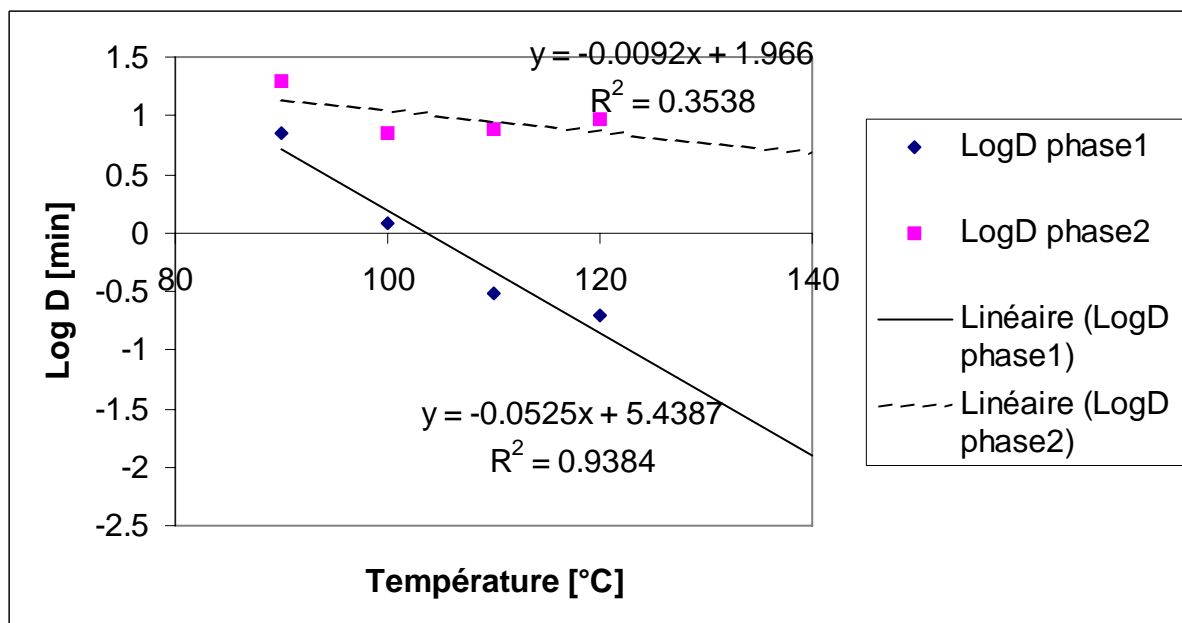
Graphique 1 : Logarithme de la valeur de réduction décimale D pour la phase 1 et 2, en fonction de la température, pour les spores de *B. atrophaeus* produites lors de ce travail de diplôme



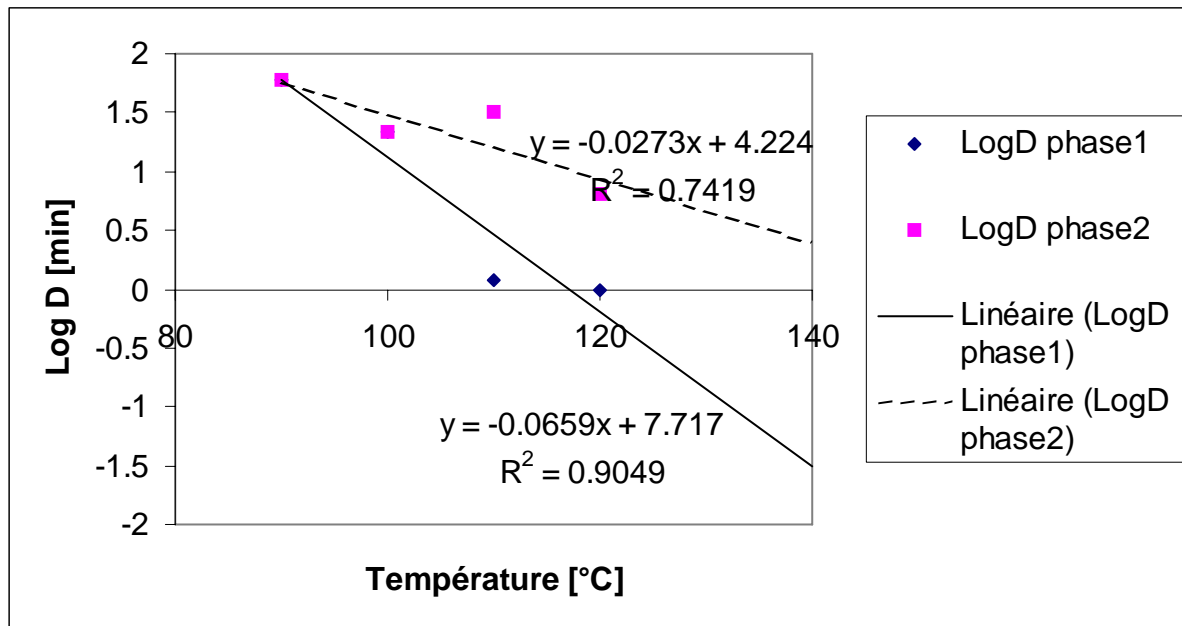
Graphique 2 : Logarithme de la valeur de réduction décimale D pour la phase 1 et 2, en fonction de la température, pour les spores de *B. atrophaeus* 6 mois après leur production par Federica Milani en 2005 [1]



Graphique 3 : Logarithme de la valeur de réduction décimale D pour la phase 1 et 2, en fonction de la température, pour les spores de *B. atrophaeus* 12 mois après leur production par Federica Milani en 2005



Graphique 4 : Logarithme de la valeur de réduction décimale D pour la phase 1 et 2, en fonction de la température, pour les spores de *B. coagulans* produites lors de ce travail de diplôme



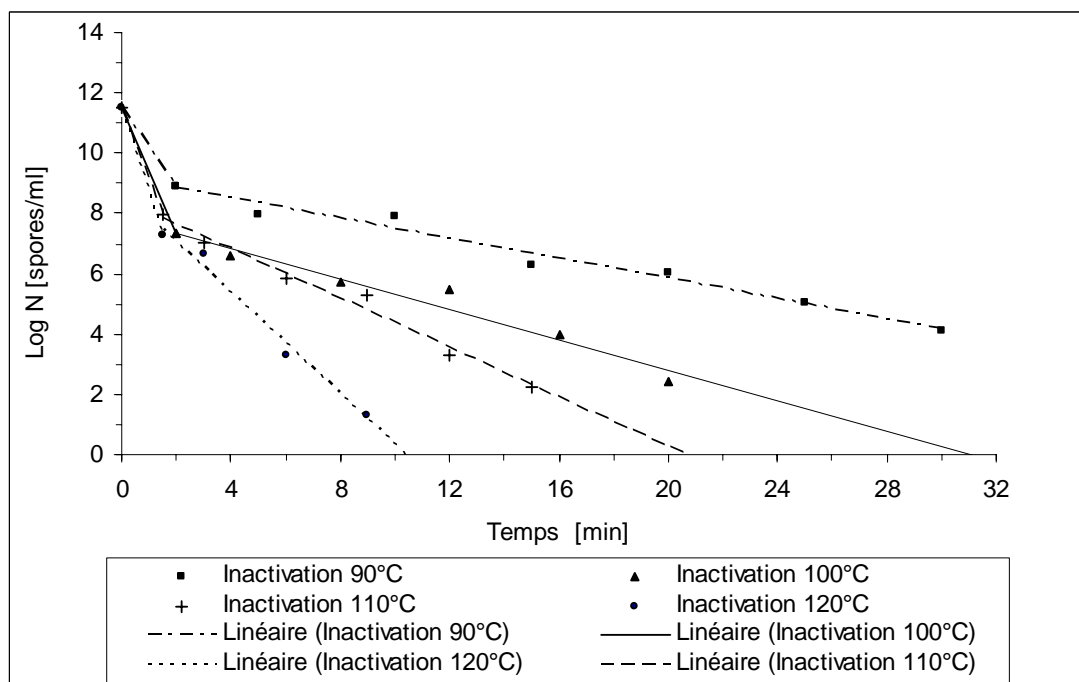
Graphique 5 : Logarithme de la valeur de réduction décimale D pour la phase 1 et 2, en fonction de la température, pour les spores de *B. cereus* produites lors de ce travail de diplôme

Remarque : Les valeurs D des températures comprises entre 90 °C et 120 °C ont été utilisées pour le calcul des valeurs z, sauf pour les phases 2 du graphique 1, ceci en raison d'imprécisions.

Les valeurs z seront données sans chiffre avec la virgule puisque les coefficients de linéarité ne sont pas toujours optimaux.

[1]: Devantéry N., Détermination de la résistance à la chaleur de spores de *Bacillus atrophaeus* par méthode capillaire, travail de semestre, HEVs, Sion, (2006), 25

COURBES D'INACTIVATION DES SPORES DE *BACILLUS ATROPHAEUS* DIRECTEMENT APRÈS LEUR PRODUCTION



Graphique 1: Inactivation de spores de *B. atrophaeus* directement après leur production, à l'aide de la méthode des sachets [1]

Tableau 1 : Valeur de réduction décimale D de 90 °C à 120 °C des spores de *B. atrophaeus*, directement après production, par Federica Milani en 2005 [1]

	Température [°C]							
	90		100		110		120	
phase	1	2	1	2	1	2	1	2
Valeur D [min]	0.8	6.0	0.5	4.0	0.4	2.4	0.3	1.2

Remarque : les températures indiquées sont à titre indicatif. Les vraies valeurs sont :
 $D_{90}1$: 87.2 °C, $D_{90}2$: 89.9°C ; $D_{100}1$: 97.1 °C, $D_{100}2$: 98.2°C ; $D_{110}1$: 99.6 °C, $D_{110}2$: 106.4°C ; $D_{120}1$: 100.6 °C, $D_{120}2$: 115.5°C

[1] : Milani F., Production de spores de *B. atrophaeus* et détermination de leur résistance à la chaleur, travail de diplôme, HEVs, (2005), 8

DESTRUCTION DES SPORES DE *BACILLUS COAGULANS* DANS DU LAIT ÉCRÉMÉ ET CONCENTRÉ

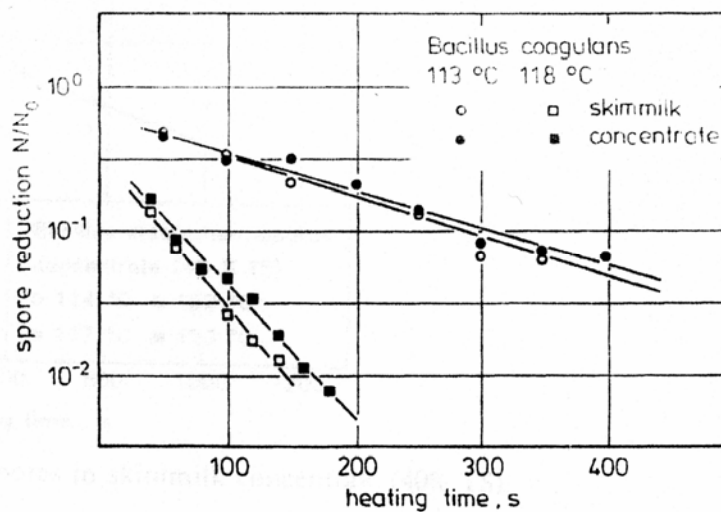


Fig. 4. Destruction of *B. coagulans* spores in skim milk and skim milk concentrate (40% TS).

[1]

[1] : Behringer R. and Kessler H.G., Thermal Destruction Kinetics of Spores of Selected *Bacillus* Strains in Skim milk and Skim milk Concentrate, International Dairy Journal, 2, 233-242, (1992)

- [1]: Milani F., Production de spores de *B. atrophaeus* et détermination de leur résistance à la chaleur, travail de diplôme, HEVs, Sion, (2005)
- [2]: Milchwissenschaftliche Forschung Weihenstephan, rapport annuel, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Technische Universität München, (2005), 88
- [3]: Russell A.D., The Destruction of Bacterial Spores, Academic Press, (1982), 41-62
- [4]: Devantéry N., Détermination de la résistance à la chaleur de spores de *Bacillus atrophaeus* par méthode capillaire, travail de semestre, HEVs, Sion, (2006), 9-25
- [5]: Heldman D.R. and Newsome R.L., Kinetic Models for Microbial Survival During Processing, Food Technology, 57, 40-46, (2003)
- [6]: Valdramidis V.P., Bernaerts K., Van Impe J.F. and Geeraerd A.H., An alternative Approach to Non-Log-Linear Thermal Microbial Inactivation: Modelling the Number of Log Cycles Reduction with Respect to Temperature, Food Technology and Biotechnology, 43, 321-327, (2005)
- [7]: Couvert O., Gaillard S., Savy S., Mafart P. and Leguérinel I., Survival curves of heated bacterial spores : effect of environmental factors on Weibull parameters, International Journal of Food Microbiology, 101, 73-81, (2004)
- [8]: Schmitt R., Cinétique d'inactivation, support de cours, HEVs, Sion, (1999), 2-5
- [9]: Busta F.F., Indicators/Surrogates vs. Pathogens, présentation power point, University of Minnesota, (2002), 24
- [10]: U. S. Food and Drug Administration, Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce, rapport de l'Institut, (2001), chapitre VII
- [11]: STS division of Ethox Corp, Biological indicators, (11.04.06),
<http://www.stsduotek.com/bio-indicators.html>
- [12]: Food Protection, Symposium Abstracts, (07.09.06),
<http://www.foodprotection.org/meetingsEducation/IAFP%202006/IAFP%2006%20Symposium%20Abstracts.pdf#search=%22symposium%20abstracts%20claudia%20coles%22>
- [13]: Schmitt R., Lebensmittelmikrobiologie, support de cours, HEVs, Sion, 46-48
- [14]: Vaisainen O.M, Mwaishumo N.J and Salkinoja-Salonen M.S, Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing,

minimum growth temperature and fatty acid analysis, *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 315-324, (1991)

[15] : Van Netten P., van de Moosdijk A., van Hoensel D. et al., Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxins, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 73-79, (1990)

[16] : Nakaruma L.K., Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 295-300, (1989)

[17] : Burke S.A., Wright J.D, Robinson M.K., Bronk B.V. and Warren R.L., Detection of Molecular Diversity in *Bacillus atrophaeus* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2786-2790, (2004)

[18] : Dagmar F. and Rüdiger P., Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 35-37, (2001)

[19] : De Vecchi E. and Drago L., *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or Mislabelling ?, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1, 3-10, (2006)

[20] : Gottschalk G. and Schlegel H.G., *Bacillus coagulans* HAMMER 1915 und andere thermophile oder mesophile, säuretolerante *Bacillus*-Arten eine taxonomische Untersuchung, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen, (1984), 54-55

[21] : Russell A.D., Hugo W.B. and Ayliffe G.A., Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation, Blackwell Scientific Publications, (1982), 457

[22] : Lehner B., Konservierung von Mikroorganismen, méthode interne DI8111, HEVs, Sion, (2005)

[23] : Luginbühl L., Cuiseuse-Extrudeuse bi-vis, Consignes de poste halle pilote agroalimentaire, HEVs, Sion, (2006)

[24] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 56 « Microbiologie », points B, C et D, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[25] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 14 « Céréales, produits de l'industrie meunière », point 1.8.1, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2000)

[26] : Brochure d'application Mettler, mettler Instrument AG, 1987, 32

[27] : Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) : chapitre 66 « Unités de mesure ». Office fédérale de la santé publique, point « Dichte », Berne, (2000)

- [28] : Bounoun K., Développement de céréales de petit-déjeuner pour les enfants, travail de diplôme, HEVs, (2005), 28
- [29] : Ryu J.H., Kim H. and Beuchat L.R., Spore Formation by *Bacillus cereus* in Broth as Affected by Temperature, Nutrient Availability and Manganese, Journal of Food Protection, 68, 1734-1738, (2005)
- [30] : Helfinstine S.L., Vargas-Aburto C., Uribe R.M. and Woolverton C., Inactivation of *Bacillus* Endospores in Envelopes by Electron Beam Irradiation, Applied and Environmental Microbiology, 71, 7029-7032, (2005)
- [31] : Young E., Characteristics of an abortively disporic variant of *Bacillus cereus*, Journal of Bacteriology, 88, 242-254, (1964)
- [32] : Barbeau B., Huffman D., Mysore C., Desjardins R., Clément B. and Prévost M., Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide, Journal of environmental Engineering and Science, 4, 139-151, (2005)
- [33] : Odlaug T.E., Caputo R.A. and Graham G.S., Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores, Applied and Environmental Microbiology, 41, 1374-1377, (1981)
- [34] : Bender G.R. and Marquis R.E., Spore Heat Resistance and Specific Mineralization, Applied and Environmental Microbiology, 50, 1414-1421, (1985)
- [35] : Peeler J.T., Reyes A.L., Crawford R.G. Wheby A.J. and Campbell J.E., Thermal Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* in a Closed System, Applied and Environmental Microbiology, 33, 52-58, (1977)
- [36] : Behringer R. and Kessler H.G., Thermal Destruction Kinetics of Spores of Selected *Bacillus* Strains in Skimmilk and Skimmilk Concentrate, International Dairy Journal, 2, 233-242, (1992)
- [37] : Fernandez Coll F. and Silva N.L., Spore age and its effect on thermal resistance of *Bacillus coagulans* and *Bacillus macerans* in acid ripe plantain puree, Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico (PRI), 75, 205-211, (1991)
- [38] : Palop A., Marco A., Raso J., Sala F.J. and Condón S., Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid, International Journal of Food Microbiology, 38, 25-30, (1997)
- [39] : ICMSF, Microorganisms in foods 5, Characteristics of microbial pathogens, Blackie academic & professional, (1996), 27-28
- [40] : Richardson K. and George B., A bulletin for the Australian Food Industry, Food Safety and Hygiene, Food Science Australia, (1999)
- [41] : Influence of Spore Moisture Content on the Dry-Heat Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*, Applied Microbiology, 16, 735-745, (1968)

- [42] : Mosley G.A., Gillis J.R. and Krushefski G., Evaluating the formulae for integrated lethality in ethylene oxide sterilization using six different endospore forming strains of bacteria, and comparisons of integrated lethality for ethylene oxide and steam systems, *Journal of pharmaceutical science and technology*, 59, 64-86, (2005)
- [43] : Anderson W.A., McClure P.J., Baird-Parker A.C. and Cole M.B., The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213 B at temperature below 121.1 °C, *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 283-290, (1996)
- [44] : Notermans S. and Batt C.A., A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84, 51S-61S, (1998)
- [45] : Kimanya M.E., Mamiro P.R.S., Van Camp J., Devlieghere F., Opsomer A., Kolsteren P. and Debevere J., Growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* during germination and drying of finger millet and kidney beans, *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 119, (2003)
- [46] : Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), Fiches microorganismes de l'Afssa : *Bacillus cereus*, (20.09.06)
<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/fiches/mic/Bacillus%20cereus/Fiche%20Bacillus%20cereus.pdf#search=%22Bacillus%20cereus%20126%20%C2%B0C%2090%20min%22>,
- [47] : Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., te Giffel M. and Peeters Weem P., A Risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk, *Food Microbiology*, 14, 143-151, (1997)
- [48] : Dervin K., Société française de statistique (SFDS), Le citoyen, les risques alimentaires et la statistique, (20.09.06)
<http://www.sfds.asso.fr/groupe/22mars2006/22mars2006CD.pdf#search=%22seuil%20acceptabil%C3%A9%20europe%20b%20cereus%22>
- [49] : Jaquette C.B. and Beuchat L.R., Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal, *Journal of Food Protection*, 61, 1629-1635, (1998)
- [50] : Likimani T.A., Sofos J.N., Maga J.A. and Harper J.M., Methodology to determine destruction of bacterial spores during extrusion cooking, *Journal of Food Science*, 55, 1388-1393, (1990)
- [51] : Okelo P.O., Wagner D.D., Carr L.E., Wheaton F.W., Douglass L.W. and Joseph S.W., Optimization of extrusion conditions for elimination of mesophilic bacteria during thermal processing of animal feed mash, *Animal Feed Science and Technology Journal*, 129, 116-137, (2006)
- [52] : Korus J., Gumul D. and Achremowicz B., The influence of extrusion on chemical composition of dry seeds of bean, *Food Science and Technology, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9, 1, (2006)

- [53] : Bulut S., Waites W.M. and Mitchell J.R., Effects of combined shear and thermal forces on destruction of *Microbacterium lacticum*, Applied Environmental Microbiology, 65, 4464-4469, (1999)
- [54] : Likimani T.A. and Sofos J.N., Bacterial spore injury during extrusion cooking of corn/soybean mixtures, International Journal of Food Microbiology, 11, 243-250, (1990)
- [55] : Monville T., Thermal Resistance of *Bacillus anthracis* Spores and Surrogates, Proceedings of the Institute of Food Technologists' First Annual Food Protection & Defense Research Conference, The State University of New Jersey, (2005)
- [56] : Nicholson W.L. and Galeano B., UV Resistance of *Bacillus anthracis* Spores Revisited: Validation of *Bacillus subtilis* Spores as UV Surrogates for Spores of *B. anthracis* Sterne, Applied and Environmental Microbiology, 69, 1327-1330, (2003)
- [57] : De Siano T., Padhi S., Schaffner D.W. and Montville T.J., Growth Characteristics of Virulent *Bacillus anthracis* and Potential Surrogate Strains, Journal of Food Protection, 69, 1720-1723, (2006)
- [58] : National Advisory Committee on Microbiological Criteria For Foods (NACMCF), Potential Scientific Parameters that Must be Considered to Establish Global Dates for Refrigerated Ready-to-Eat Foods, Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture Washington, D.C. 20250-3700, (2002)